



BERGISCHE
UNIVERSITÄT
WUPPERTAL

Phloembeladung und Zuckerstoffwechsel

in *Fagus sylvatica*, *Quercus robur*

und *Picea abies*

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Fakultät für Mathematik und Naturwissenschaften

Bergische Universität Wuppertal

Angefertigt in der
Arbeitsgruppe für molekulare Pflanzenforschung/Pflanzenbiochemie (Botanik)

Vorgelegt von

Wiebke Dorothea Mieke

aus Greifswald

Wuppertal

November 2023

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

Co-Referentin: Prof. Dr. Julia Bornhorst, Bergische Universität Wuppertal

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| Abbildungsverzeichnis | V |
| Tabellenverzeichnis | VI |
| Zusammenfassung | 1 |
| Abstract | 2 |
| 1. Einleitung | 3 |
| 1.1 Angiospermen und Laubbäume | 3 |
| 1.2 Gymnospermen und Nadelbäume | 4 |
| 1.3 Leitgewebe und Langstreckentransport in Bäumen | 5 |
| 1.3.1 Aufbau von Xylem und Phloem in Angiospermen und Gymnospermen..... | 5 |
| 1.3.2 Langstreckentransport von Saccharose in Bäumen..... | 8 |
| 1.4 Typen der Phloembeladung in Laubblättern | 10 |
| 1.4.1 Passive symplastische Phloembeladung..... | 11 |
| 1.4.2 Aktive symplastische Phloembeladung..... | 12 |
| 1.4.3 Aktive apoplastische Phloembeladung, Saccharose-Transporter und SWEETs | 13 |
| 1.4.3.1 Apoplastische Phloembeladung | 13 |
| 1.4.3.2 Saccharose-Transporter..... | 14 |
| 1.4.3.3 SWEETs..... | 16 |
| 1.5 Phloembeladung in Nadelblättern | 17 |
| 2. Fragestellung | 19 |
| 3. Material und Methoden..... | 21 |
| 3.1 Material..... | 21 |
| 3.1.1 Pflanzenmaterial | 21 |
| 3.1.2 Bakterien- und Hefestämme | 22 |
| 3.1.3 Geräte, Chemikalien und Lösungen | 22 |
| 3.1.4 Kits und Enzyme | 22 |
| 3.1.5 Plasmide | 23 |
| 3.1.6 Oligonukleotide | 24 |
| 3.1.7 Sequenzierungen | 24 |
| 3.2 Probennahme und Probenaufarbeitung..... | 24 |
| 3.3 Molekularbiologische Methoden | 25 |
| 3.3.1 Agarose-Gelelektrophorese | 25 |
| 3.3.2 RNA-Isolierung | 26 |

| | | |
|---------|--|----|
| 3.3.3 | DNase-Verdau und cDNA-Synthese..... | 27 |
| 3.3.4 | Primerdesign..... | 27 |
| 3.3.5 | Polymerase-Kettenreaktion (PCR)..... | 28 |
| 3.3.6 | Quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR) | 30 |
| 3.3.7 | Klonierungsstrategien..... | 32 |
| 3.3.7.1 | Ligation in pGEM [®] -T Easy (<i>A-Tailing</i>) | 32 |
| 3.3.8 | Mini-Plasmid-Präparation („ <i>Triton Boiling</i> “) | 33 |
| 3.4 | Mikrobiologische Methoden..... | 34 |
| 3.4.1 | Steriles Arbeiten | 34 |
| 3.4.2 | Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> | 35 |
| 3.4.3 | Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen | 35 |
| 3.4.4 | Transformation von <i>S. cerevisiae</i> | 36 |
| 3.4.5 | Herstellung von Übernachtskulturen | 37 |
| 3.4.6 | Herstellung von Dauerkulturen | 38 |
| 3.5 | Funktionsüberprüfung von Saccharose-Transportern in <i>S. cerevisiae</i> | 38 |
| 3.5.1 | Shuttle-Vektor | 38 |
| 3.5.2 | Aufnahmetests mit ¹⁴ C-Saccharose | 39 |
| 3.6 | Einbettung von pflanzlichem Gewebe..... | 39 |
| 3.6.1 | Fixierung | 40 |
| 3.6.2 | Entwässerung und Einbettung | 41 |
| 3.7 | RNA- <i>in-situ</i> -Hybridisierung..... | 42 |
| 3.7.1 | Sondensynthese | 42 |
| 3.7.2 | Dünnschnitte am Mikrotom | 45 |
| 3.7.3 | Vorbehandlung der Gewebeschnitte für die Hybridisierung..... | 45 |
| 3.7.4 | Hybridisierung und Antikörperfärbung..... | 47 |
| 3.8 | Intrazelluläre Lokalisation | 51 |
| 3.8.1 | Plasmide | 51 |
| 3.8.2 | Isolation von Protoplasten | 52 |
| 3.8.3 | Transformation von Protoplasten | 55 |
| 3.9 | Extraktionsmethoden | 55 |
| 3.9.1 | Nicht-wässrige Fraktionierung | 55 |
| 3.9.1.1 | Fraktionierung der Zellkompartimente | 55 |
| 3.9.1.2 | UDP-Glucose Pyrophosphorylase für das Zytosol..... | 57 |
| 3.9.1.3 | Saure Phosphatase für die Vakuole | 58 |
| 3.9.1.4 | NADP abhängige GAPDH für die Chloroplasten | 59 |
| 3.9.2 | Extraktion wässriger Metabolite | 59 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 3.10 | Bestimmung der Osmolalität | 60 |
| 3.11 | HPLC | 60 |
| 3.11.1 | Zucker..... | 60 |
| 3.11.2 | Anorganische Ionen..... | 61 |
| 3.12 | Photometrische Bestimmung von Stärke..... | 62 |
| 3.13 | Software, Webserver und Genomdatenbanken | 64 |
| 3.14 | Statistik | 65 |
| 4. | Ergebnisse..... | 66 |
| 4.1 | NSC-Gehalte und anorganische Ionen in <i>F. sylvatica</i> , <i>Q. robur</i> und <i>P. abies</i> | 66 |
| 4.1.1 | <i>Fagus sylvatica</i> | 67 |
| 4.1.2 | <i>Quercus robur</i> | 69 |
| 4.1.3 | <i>Picea abies</i> | 71 |
| 4.1.4 | Osmolalitäten in Blattproben unterschiedlicher Wachstumshöhen | 73 |
| 4.2 | Subzelluläre Verteilung von Zuckern zwischen Zellkompartimenten aus Blättern hoher Bäume von <i>F. sylvatica</i> und <i>Q. robur</i> | 74 |
| 4.3 | Neue Saccharose-Transporter aus <i>F. sylvatica</i> und phylogenetische Analyse von SUTs | 77 |
| 4.3.1 | Saccharose-Transporter | 77 |
| 4.3.2 | SWEET12 aus <i>Q. robur</i> und phylogenetische Analyse von SWEETs | 80 |
| 4.4 | Expression, Charakterisierung und Lokalisation von Saccharose-Transportern..... | 83 |
| 4.4.1 | Expression von Saccharose-Transportern in kleinen und hohen <i>F. sylvatica</i> und <i>Q. robur</i> | 83 |
| 4.4.2 | Organspezifische Expression von Saccharose-Transportern in <i>F. sylvatica</i> und <i>Q. robur</i> | 84 |
| 4.4.3 | Charakterisierung von SUTs und Saccharose-Aufnahme in <i>S. cerevisiae</i> | 86 |
| 4.4.4 | Expression von Saccharose-Transportern in kleinen und hohen <i>P. abies</i> | 87 |
| 4.4.5 | Organspezifische Expression von Saccharose-Transportern in <i>P. abies</i> | 88 |
| 4.5 | Zellspezifische Expression von Saccharose-Transportern | 88 |
| 4.5.1 | <i>Fagus sylvatica</i> | 89 |
| 4.5.1.1 | Expression des FsSUT1 und FsSUT2 im Blatt..... | 89 |
| 4.5.1.2 | Expression des FsSUT1 und des FsSUT2 in der Sprossachse..... | 91 |
| 4.5.1.3 | Expression des FsSUT1 in der weiblichen Blüte..... | 92 |
| 4.5.2 | <i>Picea abies</i> | 93 |
| 4.5.2.1 | Expression des PaSUT1 und PaSUT2 in <i>sink</i> -Nadeln und zweijährigen Nadeln | 93 |
| 4.5.2.2 | Expression von SUT aus <i>P. abies</i> im einjährigen Spross | 95 |

| | | |
|-----------|--|------------|
| 4.6 | Intrazelluläre Lokalisation | 96 |
| 5. | Diskussion | 97 |
| 5.1 | Untersuchung der Phloembeladung in Bäumen: Problemstellung und bisherige Erkenntnisse..... | 97 |
| 5.2 | NSC-Gehalte in hohen Bäumen der Arten <i>F. sylvatica</i> und <i>Q. robur</i> | 99 |
| 5.3 | Zuckerverteilung in den Mesophyllzellen hoher <i>F. sylvatica</i> und <i>Q. robur</i> | 101 |
| 5.4 | Aktive Phloembeladung in hohen Bäumen aus <i>F. sylvatica</i> und <i>Q. robur</i> | 102 |
| 5.5 | Gewebespezifische und zellspezifische Expression sowie Charakterisierung von Saccharose-Transportern | 106 |
| 5.5.1 | Charakterisierung von Saccharose-Transportern aus <i>F. sylvatica</i> und <i>Q. robur</i> | 106 |
| 5.5.2 | Expression von Saccharose-Transportern in hohen <i>F. sylvatica</i> und <i>Q. robur</i> .. | 110 |
| 5.5.3 | SWEETs in <i>Q. robur</i> und <i>F. sylvatica</i> | 114 |
| 5.6 | Phloembeladung in hohen <i>Picea abies</i> | 115 |
| 5.6.1 | NSC-Gehalte in <i>P. abies</i> | 115 |
| 5.6.2 | Expression von Saccharose-Transportern in <i>P. abies</i> | 117 |
| 6. | Fazit..... | 119 |
| | Literaturverzeichnis..... | 121 |
| | Anhang | 141 |
| | Abkürzungsverzeichnis | 141 |
| | Liste verwendeter Laborgeräte | 143 |
| | Liste verwendeter Chemikalien | 144 |
| | Sequenzen identifizierter SUTs und SWEETs | 146 |
| | Plasmidkarten | 148 |
| | Liste verwendeter Primer bzw. Oligonukleotide | 149 |
| | Stock-Lösungen für die <i>in-situ</i> -Hybridisierung..... | 153 |
| | Datenbanken mit Web-Adressen | 153 |
| | Danksagung..... | 154 |
| | Lebenslauf..... | 156 |
| | Erklärung..... | 157 |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abbildung 1.1 Übersicht der drei Abschnitte des Phloems: Sammelphloem, Transportphloem, Abgabephloem | 6 |
| Abbildung 1.2 Schematische Darstellung von Xylem und Phloem von Angiospermen. | 7 |
| Abbildung 1.3 Schematische Darstellung des Ferntransportes von Saccharose in Bäumen..... | 9 |
| Abbildung 1.4 <i>minor vein</i> -Typen in Laubblättern. | 11 |
| Abbildung 1.5 Passive symplastische Phloembeladung. | 12 |
| Abbildung 1.6 Aktive symplastische Phloembeladung..... | 13 |
| Abbildung 1.7 Aktive apoplastische Phloembeladung. | 14 |
| Abbildung 1.8 Struktur von Saccharose-Transportern am Beispiel des AtSUC1..... | 15 |
| Abbildung 1.9 Schematische Darstellung des <i>pre-phloem-pathways</i> in Gymnospermen. | 18 |
| Abbildung 4.1 Organspezifischen NSC-Gehalte und anorganische Ionen in kleinen und hohen <i>F. sylvatica</i> | 67 |
| Abbildung 4.2 Organspezifische NSC-Gehalte und anorganische Ionen in kleinen und hohen <i>Q. robur</i> | 69 |
| Abbildung 4.3 Organspezifische NSC-Gehalte und anorganische Kationen und Anionen in kleinen und hohen <i>P. abies</i> | 71 |
| Abbildung 4.4 Vergleich der Osmolalitäten von Blattproben kleiner und hoher Bäume von <i>F. sylvatica</i> , <i>Q. robur</i> und <i>P. abies</i> | 73 |
| Abbildung 4.5 Subzelluläre Verteilung von Zuckern in Vakuole, Chloroplasten (Stroma) und Zytosol aus Blatt- Mesophyllzellen hoher Bäume von <i>F. sylvatica</i> und <i>Q. robur</i> | 74 |
| Abbildung 4.6 Vergleich der Saccharose-Konzentrationen im Zytosol von Mesophyllzellen und im Phloemsaft von <i>F. sylvatica</i> und <i>Q. robur</i> | 76 |
| Abbildung 4.7 Visualisierung des SUT2 aus <i>F. sylvatica</i> | 78 |
| Abbildung 4.8 Visualisierung des SUT4 aus <i>F. sylvatica</i> | 78 |
| Abbildung 4.9 Phylogenetische Analyse von FsSUT2 und FsSUT4..... | 79 |
| Abbildung 4.10 Visualisierung des QrSWEET12..... | 80 |
| Abbildung 4.11 Phylogenetische Analyse ausgewählter SWEETs. | 81 |
| Abbildung 4.12 Expression von Saccharose-Transportern in kleinen im Vergleich zu hohen Bäumen von <i>F. sylvatica</i> und <i>Q. robur</i> | 83 |
| Abbildung 4.13 Vergleichende organspezifische Expression von Saccharose-Transportern in <i>F. sylvatica</i> und <i>Q. robur</i> | 85 |
| Abbildung 4.14 Expression von Saccharose-Transportern in kleinen und hohen <i>P. abies</i> | 87 |
| Abbildung 4.15 Vergleichende gewebespezifische Expression von Saccharose-Transportern in <i>P. abies</i> | 88 |
| Abbildung 4.16 Zellspezifische Expression des FsSUT1 und des FsSUT2 im Querschnitt des Blattes. | 90 |
| Abbildung 4.17 Zellspezifische Expression des FsSUT1 im Querschnitt der einjährigen Sprossachse. | 91 |
| Abbildung 4.18 Zellspezifische Expression des FsSUT2 im Spross. | 92 |
| Abbildung 4.19 Zellspezifische Expression des FsSUT1 im Querschnitt des Fruchtknotens der weiblichen Blüte..... | 93 |
| Abbildung 4.20 Zellspezifische Expression des PaSUT1 und PaSUT2 in Querschnitten von zweijährigen Nadeln..... | 94 |
| Abbildung 4.21 Zellspezifische Expression des PaSUT2 im Querschnitt von <i>sink</i> -Nadeln... | 95 |
| Abbildung 4.22 Zellspezifische Expression des PaSUT1 und PaSUT2 im Querschnitt der einjährigen Sprossachse. | 96 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|---|-----|
| Tabelle 3.1 Baumarten | 21 |
| Tabelle 3.2 Kits für die Nukleinsäureaufreinigung | 22 |
| Tabelle 3.3 Kits und Enzyme für molekularbiologische Arbeiten | 23 |
| Tabelle 3.4 Plasmide | 23 |
| Tabelle 3.5 Puffer für die Gelelektrophorese | 25 |
| Tabelle 3.6 Puffer für die RNA-Isolierung | 27 |
| Tabelle 3.7 PCR-Programm: <i>Taq</i> -Polymerase | 28 |
| Tabelle 3.8 PCR-Programm: <i>Phusion</i> - und <i>Q5</i> -Polymerase | 29 |
| Tabelle 3.9 PCR-Programm: <i>Pfu</i> -Polymerase | 29 |
| Tabelle 3.10 Standard qPCR-Programm | 31 |
| Tabelle 3.11 Primerverhältnisse in der qPCR | 32 |
| Tabelle 3.12 <i>A-Tailing</i> | 32 |
| Tabelle 3.13 Standard-Ligationsansatz | 33 |
| Tabelle 3.14 Puffer und Lösungen für die Mini-Plasmid-Präparation | 33 |
| Tabelle 3.15 Standard Restriktionsverdau | 34 |
| Tabelle 3.16 Puffer für die Herstellung kompetenter <i>E.coli</i> -Zellen | 35 |
| Tabelle 3.17 Puffer und Medien für die Transformation von <i>E. coli</i> | 36 |
| Tabelle 3.18 Medien und Lösungen für die Transformation von <i>S. cerevisiae</i> | 37 |
| Tabelle 3.19 Restriktion pNEV-N und Insert | 38 |
| Tabelle 3.20 Dephosphorylierung von pNEV-N | 39 |
| Tabelle 3.21 Fixierlösungen | 40 |
| Tabelle 3.22 Sonden-Synthese: Plasmid-Linearisierung | 43 |
| Tabelle 3.23 Sondensynthese | 43 |
| Tabelle 3.24 Sondensynthese: DNase-Verdau | 44 |
| Tabelle 3.25 Lösungen für die Gewebe-Vorbehandlung | 45 |
| Tabelle 3.26 Hybridisierungspuffer | 48 |
| Tabelle 3.27 Waschlösungen | 49 |
| Tabelle 3.28 Puffer für die Antikörper-Färbung | 49 |
| Tabelle 3.29 Restriktionsenzyme pSS87 & pCS120 | 52 |
| Tabelle 3.30 Puffer und Medien für die Protoplasten-Isolation | 54 |
| Tabelle 3.31 Lösungen für die NWF | 57 |
| Tabelle 3.32 Reaktionslösung für das UDP-Glucose-Assay | 58 |
| Tabelle 3.33 Lösungen für das saure Phosphatase-Essay | 58 |
| Tabelle 3.34 Lösungen für das GAP-DH-Essay | 59 |
| Tabelle 3.35 Zuckerbestimmung der Pflanzen-Organen | 60 |
| Tabelle 3.36 Anorganische Kationen | 61 |
| Tabelle 3.37 Anorganische Anionen | 62 |
| Tabelle 3.38 Lösungen für die photometrische Stärke-Bestimmung | 63 |
| Tabelle 3.39 Software und Webserver | 64 |
| Tabelle 3.40 Genomdatenbanken | 65 |
| Tabelle 4.1 Wassergehalt und Volumina der subzellulären Kompartimente von Blatt-Mesophyllzellen aus <i>F. sylvatica</i> und <i>Q. robur</i> | 75 |
| Tabelle 4.2 Zuckerkonzentrationen in Vakuole, Stroma und Zytosol in hohen Bäumen von <i>F. sylvatica</i> und <i>Q. robur</i> | 75 |
| Tabelle 4.3 Funktionsüberprüfung der SUTs in <i>F. sylvatica</i> und <i>Q. robur</i> | 87 |
| Tabelle 5.1 Km-Werte ausgewählter SUTs | 108 |

Zusammenfassung

Das Phloem bildet in Pflanzen das Leitgewebe für Photoassimilate wie Saccharose. Die Phloembeladung bildet den ersten Schritt bei der Verteilung von Saccharose von den Blättern zu Früchten, Wurzeln und anderen Organen. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Mechanismus der Beladung des Phloems mit Saccharose in den beiden Laubbaumarten *Fagus sylvatica* (dt. Rotbuche) und *Quercus robur* (dt. Stieleiche) sowie in der Konifere *Picea abies* (dt. Gemeine Fichte) zu untersuchen. Hierbei sollten insbesondere Unterschiede in der Zuckerverteilung und Phloembeladung in Abhängigkeit von der Wachstumshöhe bzw. dem Alter der Bäume herausgearbeitet werden.

Für die untersuchten Laubbaumarten *F. sylvatica* und *Q. robur* konnte gezeigt werden, dass sich die Konzentrationen von Zuckern sowie ihre Verteilung innerhalb der Zellfraktionen aus Blatt-Mesophyllzellen in kleinen und hohen Bäumen nur unwesentlich voneinander unterscheiden. Zudem sind Saccharose-Transporter (SUTs) in hohen Bäumen auf einem ähnlichen Niveau wie in kleinen Bäumen exprimiert. Daher kann auch in hohen Bäumen ein rein passiver Beladungsmechanismus des Phloems durch Diffusion ausgeschlossen werden. Vielmehr scheint es in hohen Bäumen ebenfalls aktive Schritte bei der Phloembeladung zu geben, an welchen SUTs beteiligt sind. Im Rahmen der weiteren Untersuchungen zu SUTs ist es gelungen, zwei zusätzliche vollständige cDNA-Sequenzen der Transporter FsSUT2 und FsSUT4 aus *F. sylvatica* so isolieren. Zudem konnte gezeigt werden, dass alle SUTs der beiden Laubbaumarten Saccharose aufnehmen und durch die Plasmamembran transportieren können. In Rahmen der zellspezifischen Expression mittels *in-situ*-Hybridisierung konnte die mRNA des FsSUT1 sowie der FsSUT2 u.a. im Phloem von Blättern und Rinde sowie auch in den Samenanlagen der weiblichen Blüten lokalisiert werden. Dies deutet darauf hin, dass diese SUTs nicht nur an der Phloembeladung sondern auch an physiologischen Prozessen in Blüten bzw. Früchten beteiligt sein könnten. In der Konifere *P. abies* liegen die Zuckerkonzentrationen in kleinen und hohen Bäumen ebenfalls auf einem vergleichbaren Niveau. Auf den Mechanismus der Phloembeladung können jedoch weniger Rückschlüsse gezogen werden als bei den untersuchten Laubbaumarten, da die genaue Verteilung der Zucker innerhalb der Zellfraktionen des Mesophylls bislang nicht untersucht werden konnte und zudem auch keine Daten zu den Zuckerkonzentrationen im Phloensaft vorliegen. Allerdings sind auch in hohen *P. abies* Saccharose-Transporter auf einem ähnlichen Level exprimiert wie in kleinen Bäumen. Zudem konnte die mRNA des PaSUT1 sowie des PaSUT2 ebenfalls u.a. im Phloem in Nadeln und Zweigen lokalisiert werden, was auf eine Beteiligung an der Phloembeladung sowie auch an der Rückgewinnung von Saccharose in das Transportphloem hinweist.

Abstract

In plants, the phloem is part of the vascular tissue and is responsible for the transport of photoassimilates such as sucrose. Phloem loading is the first step for the distribution of sucrose from leaves to fruits, roots and other organs. The aim of the study was to investigate the mechanism of phloem loading in the two deciduous tree species, *Fagus sylvatica* (European beech) and *Quercus robur* (Common oak), and in the conifer *Picea abies* (Norway spruce). Previous studies have shown active steps in phloem loading in small saplings of *F. sylvatica* and *Q. robur*. The phloem loading mechanism in tall trees is still unknown. Therefore, differences in sugar distribution and phloem loading depending on tree height and age were investigated.

For the deciduous tree species *F. sylvatica* and *Q. robur* it has been demonstrated that the concentrations of sugars and their distribution in the cell fractions of the leaf mesophyll cells from tall trees do not show differences compared to small trees. Moreover, sucrose uptake transporters (SUTs) are expressed at similar levels in small and tall trees. For this reasons a passive phloem loading mechanism can be excluded, and an active step in phloem loading including the presence of SUTs seems likely for tall trees as well. In addition two more full-length-sequences of SUTs could be isolated from *F. sylvatica* (FsSUT2 and FsSUT4). Heterologous yeast expression has shown that all SUTs from both tree species are able to translocate sucrose across the plasma membrane. The cell specific expression of FsSUT1 and FsSUT2 in *F. sylvatica* was investigated by RNA in situ hybridization and the mRNA of both SUTs was localized in the phloem of leaves and bark. In addition, FsSUT1 mRNA was expressed in the ovules of female flowers. This suggests that SUTs are not only involved in phloem loading but also in other physiological processes in sink tissues such as fruits.

In the conifer *Picea abies* the sugar concentrations in small and tall trees are also comparable with each other and sucrose uptake transporters are expressed at similar levels in small and tall trees. Despite these results the mechanism of phloem loading in this species remains controversial. Until now it has not been possible to analyze the distribution of sugars in the mesophyll cell fractions of leaves from *P. abies*. In addition, there are no data on the sugar concentrations in the phloem sap. This can be explained by the fact, that due to the anatomy of conifer needles it is more difficult to collect phloem sap compared to deciduous leaves. Nevertheless, it was possible to localize PaSUT1 and PaSUT2 mRNA in the phloem of needles and branches, indicating an involvement of SUTs in active phloem loading and in the long-distance sucrose transport.

1. Einleitung

1.1 Angiospermen und Laubbäume

Angiospermen (dt. Bedecktsamer) bilden mit ca. 300.000 Arten die dominierende Gruppe der Samenpflanzen und umfassen somit mehr Arten als die übrigen Gruppen der Landpflanzen, zu welchen z.B. Algen, Lebermoose, Farne, Schachtelhalme oder Gymnospermen zählen (Crane *et al.*, 1995; Christenhusz und Byng, 2016). Ihr Name leitet sich aus den griechischen Wörtern „*angeion*“ (dt. Behälter, Gefäß) und „*sperma*“ (dt. Samen) ab und deutet somit auf ihr spezifisches Merkmal hin, dass die Samenanlagen und Samen in einen Fruchtknoten eingeschlossen sind (Sompid Samipak, 2009; Sadava *et al.*, 2019). Vor 140 – 150 Mio. Jahren haben sich die ersten Angiospermen entwickelt (Soltis *et al.*, 2008; Gomez *et al.*, 2015). Die Monokotyledonen (dt. Einkeimblättrige) sowie Dikotyledonen (dt. Zweikeimblättrige) bilden die beiden größten Gruppen der Angiospermen. Neben der Anzahl der Keimblätter unterscheiden sich monokotyle und dikotyle Pflanzen oft durch ihr äußeres Erscheinungsbild und andere anatomische Merkmale. Während die monokotylen Pflanzen beispielsweise häufig eher eine krautige Wachstumsform besitzen und ihre Sprossachse keine Verholzung aufweist, sind dikotyle Pflanzen zum sekundären Dickenwachstum in der Lage, ihre Sprossachse kann somit verholzt sein. Diese Verholzung der Sprossachse verleiht den dikotylen Pflanzen eine enorme Stabilität und ermöglicht den Transport hoher Mengen an Wasser, wodurch ein Wachstum in die Höhe in größerem Maße möglich ist als bei monokotylen Pflanzen (Sadava *et al.*, 2019).

In der Gruppe der dikotylen Angiospermen stellen die Laubbäume bezogen auf die Wachstumshöhe die größten Vertreter dar. Die Familie der Fagaceae bildet dabei die am häufigsten vorkommende Gruppe von Laubbäumen in der nördlichen Hemisphäre (Manos *et al.*, 2001). In Europa ist die Rotbuche (lat. *Fagus sylvatica*) eine der wichtigsten und dominierenden Arten aus der Familie der Fagaceae. Sie ist insbesondere in Mitteleuropa stark verbreitet, wo sie auch monospezifische Wälder bildet (Bolte *et al.*, 2007; Leuschner, 2020). Trotz dieser Durchsetzungsstärke in europäischen Wäldern gilt die Rotbuche als abhängig von ausreichender Feuchtigkeit, weswegen ihr Ausbreitungsgebiet im Süden Europas durch die dortigen trockenen Standortbedingungen begrenzt wird (Geßler *et al.*, 2006). Einer Modellrechnung von Del Martinez Castillo *et al.* (2022) zufolge werden die Bestände von *Fagus sylvatica* aufgrund steigender Hitze und Trockenheit bis 2090 demnach um 20 bis 50 % sinken. Neben der Rotbuche ist die Stieleiche (lat. *Quercus robur*) eine der in Europa am weitesten verbreiteten Baumarten und stellt die in den größten Beständen vorkommende Eichenart dar. Sie kommt überwiegend in europäischen Mischwäldern vor, wo sie ebenso wie

die Rotbuche feuchte Standortbedingungen bevorzugt. Allerdings bildet sie tiefe Pfahlwurzeln aus, die es ihr ermöglichen, auch mäßige Dürreperioden zu überstehen. Trotzdem wird sich das Verbreitungsgebiet von *Q. robur* in Zukunft eher über die gemäßigten, kontinentalen Zonen erstrecken (Edward Eaton *et al.*, op. 2016).

1.2 Gymnospermen und Nadelbäume

Gymnospermen (dt. Nacktsamer) bilden neben den Angiospermen die zweite Gruppe der Samenpflanzen, die jedoch mit einer Anzahl von ca. 1000 Arten deutlich kleiner ist (Wang und Ran, 2014). Ihr Name leitet sich aus dem Griechischen für „*gymnos*“ (dt. nackt) und „*sperma*“ (dt. Samen) ab und deutet auf die sich von den Angiospermen unterscheidende Eigenschaft hin, dass ihre Samen nicht in einen Fruchtknoten eingeschlossen sind. Gymnospermen stellen die ursprüngliche Form der Samenpflanzen dar. Sie entwickelten sich vor ca. 365 Mio. Jahren und waren somit bis vor 65 Mio. Jahren die auf der Erde dominierenden Samenpflanzen, wurden jedoch in der Erdentwicklung weitestgehend von den Angiospermen verdrängt (Nabors und Scheibe, 2009; Sadava *et al.*, 2019). Die noch lebenden Gymnospermen werden in 4 Gruppen eingeteilt: die Palmfarne oder Cycadeen, die Ginkkogewächse, die Gnetumgewächse sowie die Koniferen oder Nadelbäume. Letztere sind mit 700 Arten die am weitesten verbreiteten Gymnospermen (Sadava *et al.*, 2019). Wie dikotyle Angiospermen sind auch Gymnospermen zum sekundären Dickenwachstum fähig, beide Samenpflanzen unterscheiden sich jedoch hinsichtlich ihres Leitgefäßsystems voneinander. Während das Xylem (Holz) der Angiospermen aus Tracheiden und den großlumigen Tracheen besteht und somit eine effektivere Versorgung mit Wasser und eine höhere Stabilität der Sprossachse gewährleistet ist, weist das Holz der Gymnospermen nur Tracheiden auf (zum detaillierten Aufbau von Xylem und Phloem siehe Abs. 1.3.1). Trotz dieses scheinbar uneffektiveren Leitgefäßsystems, scheint das nur auf Tracheiden basierende Xylem der Gymnospermen hinsichtlich Wasserversorgung und Stabilisierung der Pflanzen sehr wirkungsvoll zu sein. So gehören mit einer Höhe von über 100 m (*Sequoia sempervirens*, dt. Küstenmammutbaum) die höchsten und mit einem Alter von bis zu 4800 Jahren (*Pinus longaeva*, dt. Langlebige Kiefer) die ältesten Bäume der Erde zu den Gymnospermen bzw. zu den Koniferen (Hacke *et al.*, 2005). Die am häufigsten in deutschen Wäldern vorkommende Baumart ist die Gemeine Fichte (lat. *Picea abies*) (Bundeswaldinventur 2012), welche zu den immergrünen Koniferen gehört. Das natürliche Verbreitungsgebiet von *P. abies* erstreckt sich hauptsächlich in dem Bereich der borealen Nadelwälder in Nord- und Nordosteuropa. In Deutschland gibt es die größten natürlichen Vorkommen in den Alpen, kleinere Vorkommen sind im Bayrischen Wald, im Schwarzwald oder im Harz vorhanden (Farjon, 2017). Trotzdem die Gemeine Fichte eher feuchte, kühlere Standorte bevorzugt, wurde

sie aufgrund ihres schnellen Wachstums seit dem 16. Jahrhundert flächendeckend für Aufforstungen verwendet (Boden *et al.*, 2014).

1.3 Leitgewebe und Langstreckentransport in Bäumen

1.3.1 Aufbau von Xylem und Phloem in Angiospermen und Gymnospermen

Als photoautotrophe Lebewesen können Pflanzen ihren Bedarf an energiereichen organischen Kohlenstoffverbindungen selbst decken. Während der Photosynthese wird neben Sauerstoff das Disaccharid Saccharose als Endprodukt gebildet. Diese wird im Zytosol der Mesophyllzellen von Blättern produziert und von dort aus in der restlichen Pflanze verteilt (Levine, 2011). Saccharose ist in den meisten Pflanzen die Haupttransportform von Zuckern, sie stellt für alle pflanzlichen Zellen die Energiequelle für viele Stoffwechselwege dar, wie z.B. für die Produktion von Aminosäuren oder Nukleotiden (Stein und Granot, 2019). Der Transport von Saccharose und anderen Zuckern findet in der Sprossachse von Pflanzen im Phloem statt, welches zusammen mit dem Xylem das Leitgewebe bzw. das Leitbündel in Pflanzen bildet. Im Xylem werden Wasser und Mineralstoffe von den Wurzeln zu den Blättern transportiert (McCulloh *et al.*, 2003).

Das Leitgewebe erstreckt sich hauptsächlich über die Sprossachse bzw. den Stamm von Pflanzen, jedoch sind auch Laub- und Nadelblätter, Zweige sowie Seitenwurzeln in das Leitgefäßsystem mit eingebunden. Bei verholzten Angiospermen und Gymnospermen führt das sekundäre Dickenwachstum von Xylem und Phloem zu einer Verdickung der Sprossachse, während welcher die sekundären Leitgewebe gebildet werden. Das so gebildete sekundäre Xylem bildet das Holz, während das sekundäre Phloem als „Bast“ bezeichnet wird und einen Teil der Rinde bildet (Nobel, 2009). Als „primäres“ Phloem bzw. Xylem werden die beiden Zelltypen des Leitbündels vor dem sekundären Dickenwachstum bezeichnet.

Das Phloem kann in drei Teile aufgeteilt werden: Sammelpfloem, Transportphloem und Abgabe- bzw. Entladungspfloem (van Bel, 2003). Das Sammelpfloem liegt in den kleinsten Blattadern (engl. *minor veins*) der Blätter, von wo aus die Beladung des Transportphloems mit Photoassimilaten wie Saccharose erfolgt. Die Blätter des Sammelpfloems werden daher als *source*-Organe bezeichnet, in welchen große Mengen an Saccharose gebildet werden. Das Transportphloem wird von der Sprossachse bzw. dem Bast im Stamm von verholzten Pflanzen gebildet, hier werden die Photoassimilate transportiert. Das Abgabe- bzw. Entladungspfloem liegt an wachsenden, generativen oder speichernden Pflanzenorganen, welche als *sink*-Organe bezeichnet werden (van Bel und Hess, 2003). Diese pflanzlichen Organe, zu welchen beispielsweise Wurzeln, Früchte oder auch Holz gehören, betreiben keine oder nur

eingeschränkt Photosynthese und können ihren Bedarf an Kohlenstoffverbindungen wie Saccharose somit selbst nicht decken (Novaes *et al.*, 2010; DeSchepper *et al.*, 2013; Knoblauch und Peters, 2017). Eine Übersicht der drei Abschnitte des Phloems (Sammel-, Transport- und Abgabephloem) anhand eines Laubbaums zeigt die folgende Abbildung. Das Abgabephloem wird hierbei für die vereinfachte Darstellung nur durch die Wurzeln symbolisiert.

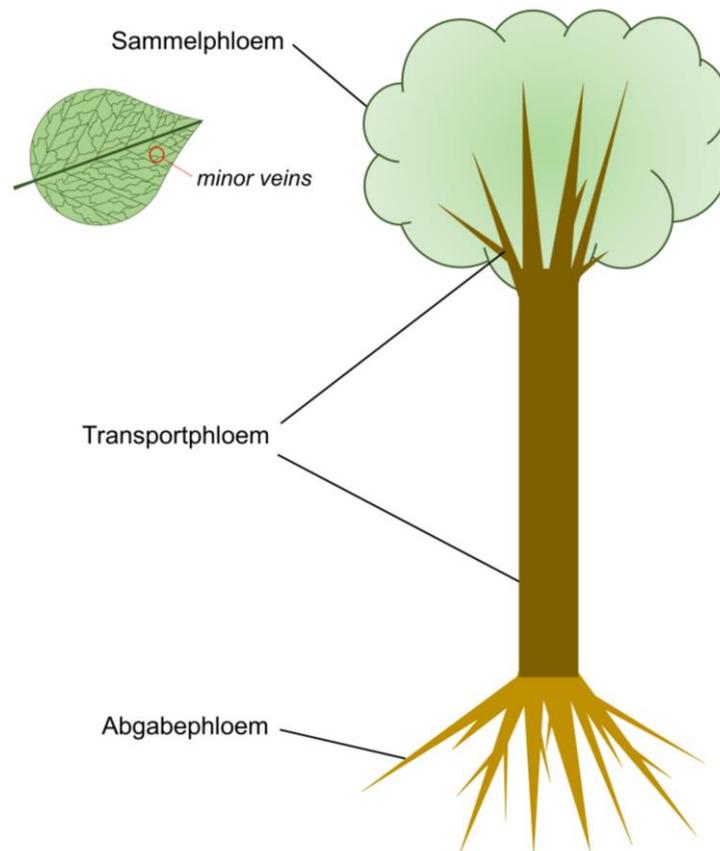


Abbildung 1.1 Übersicht der drei Abschnitte des Phloems: Sammelphloem, Transportphloem, Abgabephloem

Der Stofftransport im Transportphloem erfolgt über die Siebelemente, welche sich bei Angiospermen und Gymnospermen unterscheiden. In Angiospermen sind die Siebelemente die hochspezialisierten sog. Siebröhren. Eine Siebröhre besteht aus aneinander gereihten Siebröhrenelementen, welche durch Querwände (Siebplatten) miteinander in Verbindung stehen. Diese Siebplatten enthalten mehrere Siebfelder, die von Siebporen durchbrochen sind. Siebröhren verlieren während ihrer Differenzierung beim Pflanzenwachstum ihren Zellkern sowie den Tonoplasten bzw. die Vakuole (Evert, 2009). Die Siebröhrenelemente sind weiterhin mit Geleitzellen assoziiert, wobei es sich um lebende, parenchymatische Zellen handelt, welche für die Be- und Entladung der Siebröhren mit Saccharose und anderen Photoassimilaten verantwortlich sind. Ein Siebröhrenelement kann dabei mit einer oder mehreren Geleitzellen

assoziiert sein. Die beiden Zelltypen des Phloems werden gemeinsam als Siebröhren-Geleitzellkomplex bzw. Siebelement-Geleitzellkomplex (engl. *SE-CC-complex*, *sieve-element-companion-cell-complex*) bezeichnet (Evert, 2009; Kück und Wolff, 2014).

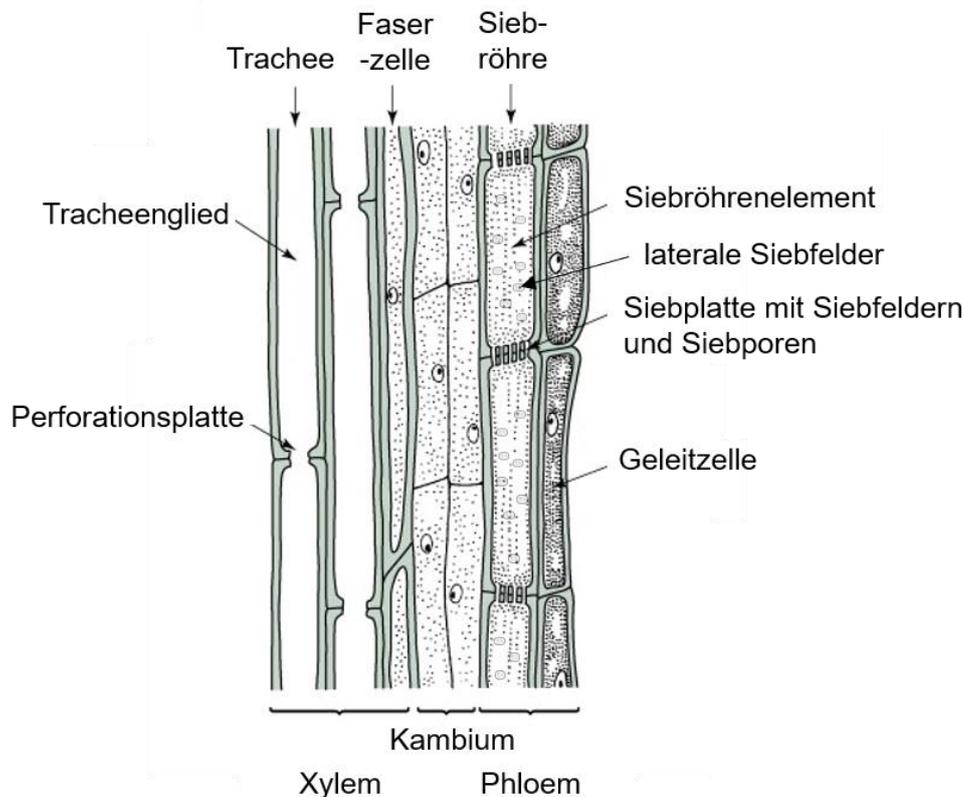


Abbildung 1.2 Schematische Darstellung von Xylem und Phloem von Angiospermen. Aus Nobel, 2009, modifiziert. Tracheiden fehlen, Faserzellen dienen der Stützung und Stabilisierung des Komplexes

In den Gymnospermen besteht das Phloem aus sog. Siebzellen und Strasburger-Zellen. Erstere übernehmen wie die Siebröhrenelemente der Angiospermen den Stofftransport. Es handelt sich bei den Siebzellen um langgezogene Zellen, die sich von den Siebröhrenelementen hinsichtlich des Fehlens der Siebplatten als Querwände zwischen den benachbarten Zellen unterscheiden. Die horizontal und längs stehenden Querwände der Siebzellen sind von zahlreichen Siebfeldern mit Siebporen durchzogen, durch welche der Stofftransport stattfindet. Die Funktion der Geleitzellen übernehmen in den Gymnospermen die Strasburger-Zellen. (Evert, 2009).

Neben den genannten Zellen besteht das Phloem aus Parenchymzellen. Diese grenzen an die Siebelemente oder die Geleitzellen an und können ebenfalls an der Be- oder Entladung von gelösten Stoffen in bzw. aus dem Phloem beteiligt sein. Zudem fungieren sie als Speicherzellen (Thompson und Wang, 2003; Wei *et al.*, 2021). Darüber hinaus wird vermutet, dass die

Phloemparenchymzellen an der Abwehr von Pflanzenfressern oder Pathogenen beteiligt sind (Franceschi *et al.*, 2000; Narváez-Vásquez und Ryan, 2004). Primäres und sekundäres Phloem können darüber hinaus sklerenchymatische Zellen enthalten, welche der Stabilisierung und dem Schutz der Phloemzellen dienen oder ebenfalls Speicherfunktionen erfüllen (Thompson und Wang, 2003).

Das Xylem besteht sowohl bei Angiospermen als auch bei Gymnospermen aus Tracheiden, einem lang gestreckten, zugespitzt endenden Zelltyp, dessen Querwände reich getüpfelt sind (Vgl. Abbildung 1.2). Über diese Tüpfel erfolgt die Wasserleitung von einer Zelle zur nächsten (Kück und Wolff, 2014). Daneben besitzt das Xylem von Angiospermen die großlumigen Tracheen als zweiten Zelltyp, welche im Gegensatz zu den Tracheiden keine getüpfelten Querwände, sondern offene Perforationsplatten zwischen den einzelnen Zellen besitzen und somit höhere Mengen Wasser transportieren können. Sie sind in Angiospermen das wesentliche und wichtigste Element der Wasserleitung (Słupianek *et al.*, 2021). Sowohl bei den Tracheiden als auch bei den Tracheen handelt es sich um abgestorbene, verholzte Zellen. Neben diesen Zelltypen besitzt das Xylem von Gymnospermen und Angiospermen zu einem wesentlichen Teil auch lebende Parenchymzellen, denen vielseitige Funktionen zugeschrieben werden. Zu diesen gehören z.B. der Transport von löslichen Zuckern und Stärke in den Transpirationssog der Tracheen bzw. Tracheiden oder die Speicherung von Wasser. Im Falle von Trockenstress können die Pflanzen Wasser aus den Xylemparenchymzellen nutzen um die Funktionen des Leitgefäßsystems aufrecht zu erhalten (Boer und Volkov, 2003; Bucci *et al.*, 2003; Secchi *et al.*, 2017; Słupianek *et al.*, 2021).

1.3.2 Langstreckentransport von Saccharose in Bäumen

Um von den Orten ihrer Bildung (*source*) zu den Orten ihres Verbrauchs (*sink*) zu gelangen, müssen Photoassimilate besonders in Bäumen weite Strecken zurücklegen. Die Saccharose ist unter den während der Photosynthese gebildeten Assimilaten von besonderer Bedeutung und wird von den meisten Bäumen als Transportform von Kohlenhydraten verwendet (Lemoine *et al.*, 2013). Eine weitestgehend akzeptierte Theorie, die den Ferntransport von Saccharose und anderen Stoffen erklärt, wurde von Ernst Münch mit der Druckstromtheorie aufgestellt (Münch, 1930). Diese stützt sich auf das Vorhandensein eines Konzentrationsgradienten von Saccharose zwischen *source*- und *sink*-Gewebe. Die in den Blättern produzierte Saccharose gelangt ins Transportphloem, wo somit die Konzentration der gelösten Teilchen und der osmotische Druck erhöht werden. Aufgrund des so entstehenden osmotischen Gefälles zwischen den beiden Enden des Transportphloems strömt Wasser aus dem Xylem in den oberen Teil des

Transportphloems, in welches die Saccharose aus dem Sammelpfloem entladen wurde. Die Saccharose wird nun aufgrund des gestiegenen hydrostatischen Drucks in Richtung des Entladephloems zu den *sink*-Gewebe transportiert, wo sie entweder aktiv oder passiv entladen wird. Durch diesen Entladungsprozess sinkt nun der osmotische Druck im Transportphloem, wodurch Wasser wieder aus dem Phloem herausgeströmt wird (Turgeon und Medville, 2004; Ryan und Asao, 2014).

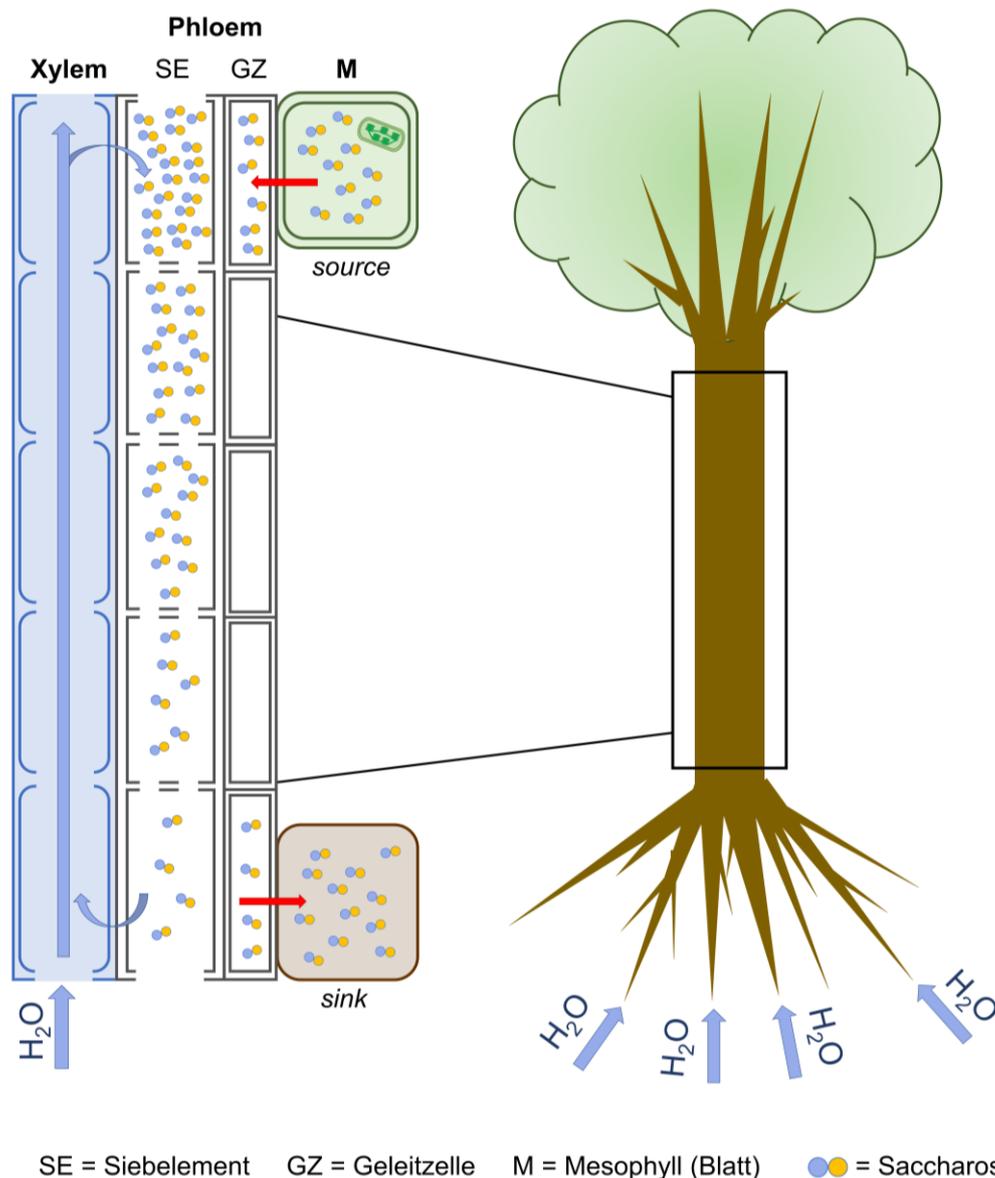


Abbildung 1.3 Schematische Darstellung des Ferntransportes von Saccharose in Bäumen.

Saccharose wird in den Mesophyllzellen der Blätter im Sammelpfloem (*source*-Gewebe) gebildet, gelangt von dort aus ins Transportphloem und wird entlang eines osmotischen Gefälles ins Abgabephloem (*sink*-Gewebe) transportiert. Abbildung basiert auf: van Bel und Hafke, 2005; Lemoine *et al.*, 2013; Savage *et al.*, 2016; Falchi *et al.*, 2020

1.4 Typen der Phloembeladung in Laubblättern

Der erste Schritt für die Verteilung von Saccharose in der gesamten Pflanze ausgehend von den *source*-Organen ist die Phloembeladung. Bei der Untersuchung dieser wird zunächst die Anatomie der *minor veins* der Blätter betrachtet. Die Zelltypen dieser kleinsten Blattleitbündel, welche in die Phloembeladung involviert sind, sind die Zellen des Siebelement-Geleitzell-Komplexes sowie die Mesophyllzellen und die daran assoziierten Bündelscheiden- bzw. Phloemparenchymzellen. Abhängig von der Anzahl der Plasmodesmen, über welche diese Zelltypen miteinander assoziiert sind, lassen sich nach Gamaleis Definition von 1989 im Wesentlichen zwei verschiedene *minor vein*-Typen voneinander unterscheiden (Gamaleis, 1989): der offene Typ 1 und der geschlossene Typ 2. Im offenen *minor vein*-Typ 1 (Abbildung 1.4 A) befinden sich zahlreiche Plasmodesmen zwischen den Mesophyllzellen und den Geleitzellen des Phloems, wodurch ein symplastischer Transport von Saccharose möglich ist. Der offene *minor vein*-Typ 1 lässt sich nochmals in zwei Typen aufteilen, die sich hinsichtlich der Anatomie der Geleitzellen voneinander unterscheiden. Der erste Beladungstyp 1 besitzt gewöhnliche Geleitzellen, in welchen zu einem großen Teil Saccharose transportiert wird. Der zweite Typ 1 ist charakterisiert durch sog. „Intermediärzellen“ anstatt der gewöhnlichen Geleitzellen, in welchen neben Saccharose auch Oligosaccharide transportiert werden (van Bel, 2003; Voitsekhovskaja *et al.*, 2009). Der geschlossene Typ 2 (Abbildung 1.4 B) hingegen weist keine bzw. eine geringe Anzahl an Plasmodesmen an der Schnittstelle zwischen Mesophyllzellen und Geleitzellen auf, weswegen der Transport von Saccharose in die Geleitzellen hier über den Apoplasten und somit aktiv durch Transportproteine erfolgen muss (Turgeon und Medville, 2004; DeSchepper *et al.*, 2013).

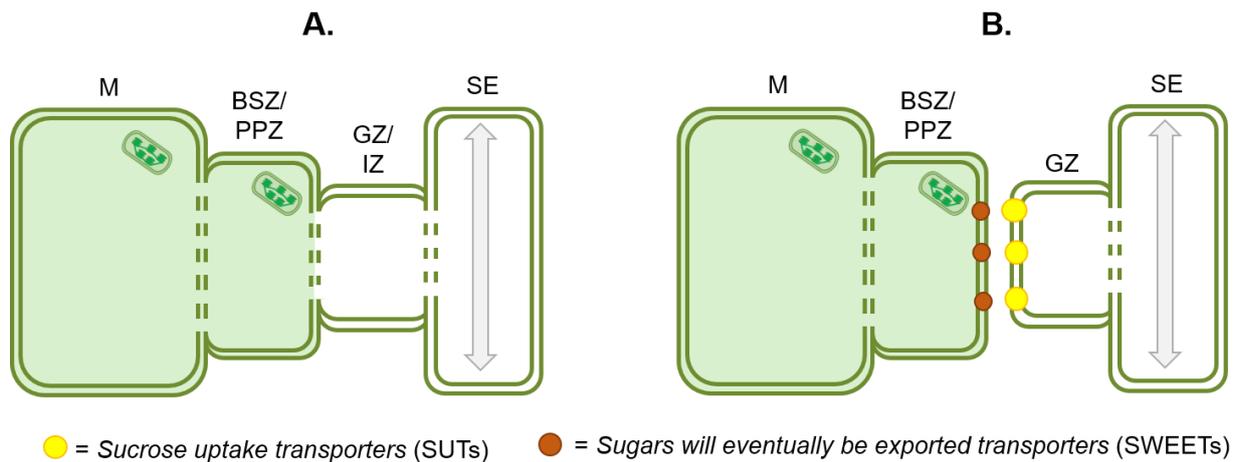


Abbildung 1.4 minor vein-Typen in Laubblättern. A.: der offene minor vein-Typ 1, charakterisiert durch zahlreiche Plasmodesmen zwischen Mesophyllzellen (M), den Bündelscheidenzellen (BSZ) und Phloemparenchymzellen (PPZ) und den Geleitzellen (GZ) bzw. den Intermediärzellen (IZ) des Phloems. B.: der geschlossene minor vein-Typ 2, charakterisiert durch wenige oder gänzlich fehlende Plasmodesmen zwischen M, BSZ und PPZ und den GZ. Der Transport von Saccharose in Phloem findet hier über spezifische Transporter statt (orangene bzw. gelbe Kreise)

1.4.1 Passive symplastische Phloembeladung

Hinter der passiven Phloembeladung steht der simpelste Mechanismus der drei Beladungsstrategien (Abbildung 1.5). Saccharose und andere Transportverbindungen werden aufgrund eines Konzentrationsgefälles zwischen den Mesophyllzellen und den Geleitzellen über Diffusion transportiert. Die erste Voraussetzung für eine passive Beladung ist eine hohe Anzahl an Plasmodesmen zwischen den Mesophyllzellen sowie den Geleitzellen des Phloems. Zum Anderen setzt diese Beladungsstrategie eine höhere Konzentration von Transportverbindungen in den Mesophyllzellen im Vergleich zu den Geleitzellen voraus, aufgrund derer die Verbindungen entlang eines thermodynamischen Konzentrationsgradienten ins Phloem diffundieren (Rennie und Turgeon, 2009; Slewinski *et al.*, 2013). Insbesondere für Bäume wurde dieser Mechanismus der Phloembeladung postuliert, da diese weitaus höhere Saccharose-Konzentrationen im Zytosol der Mesophyllzellen aufweisen als krautige Pflanzen. So konnten Russin und Evert (1985) in Plasmolyse-Experimenten mit *Populus deltoides* (dt. Kanadische Schwarz-Pappel) zeigen, dass die Mesophyllzellen der Blätter höhere Konzentrationen an Kohlenstoffverbindungen aufwiesen als andere Zelltypen. Zudem beobachteten sie eine hohe Dichte an Plasmodesmen zwischen den an der Phloembeladung beteiligten Zelltypen. Auch in *Salix babylonica* L. (dt. Echte Trauerweide) konnten in ähnlichen Experimenten ebenfalls höhere Zuckerkonzentrationen in den Blatt-Mesophyllzellen im Vergleich zu den übrigen Zelltypen der Blätter gezeigt werden (Turgeon und Medville, 2004).

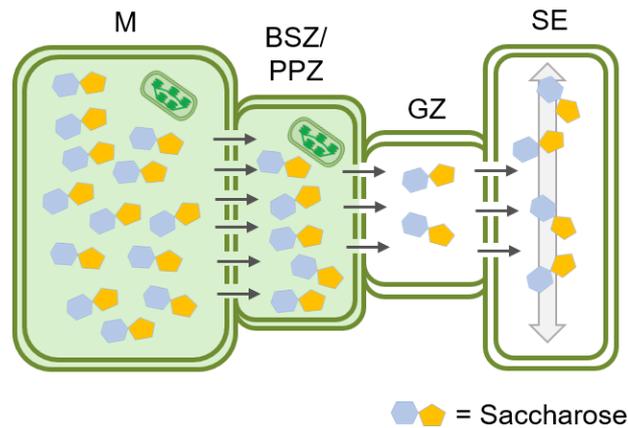


Abbildung 1.5 Passive symplastische Phloembeladung. Saccharose gelangt von den Mesophyllzellen (M) über die Bündelscheidenzellen (BSZ) bzw. Phloemparenchymzellen (PPZ) entlang eines Konzentrationsgefälles in die Geleitzellen (GZ) und von dort aus in die Siebelemente (SE). Die Konzentration von Saccharose ist in den Mesophyllzellen höher als im Siebelement-Geleitzell-Komplex (SE-CC-Komplex). Abbildung basiert auf: Rennie und Turgeon, 2009; Liesche und Patrick, 2017; Miras *et al.*, 2022

1.4.2 Aktive symplastische Phloembeladung

Die aktive Form der Phloembeladung, die ebenso wie die passive Beladung symplastisch erfolgt, wird auch als „*polymer trapping*“ bezeichnet (Abbildung 1.6). Die Funktion der Geleitzellen bei der passiven symplastischen Beladung übernehmen hier sog. Intermediärzellen. Diese Zellen sind größer als gewöhnliche Geleitzellen. Sie sind über eine große Anzahl an Plasmodesmen mit den benachbarten Mesophyllzellen bzw. Bündelscheidenzellen verbunden (Turgeon *et al.*, 1993). Der Begriff „*polymer trapping*“ bezieht sich auf die Funktion der Intermediärzellen als Ionenfalle: Die Saccharose diffundiert durch Plasmodesmen von den Mesophyllzellen in die Intermediärzellen, wo sie zu einem großen Teil in Oligosaccharide wie Raffinose oder Stachyose (RFOs, engl.: *raffinose family oligosaccharides*) umgewandelt wird. Durch ihre Größe und eine stärkere Verzweigung der Plasmodesmen auf Seiten der Intermediärzellen verglichen mit der Seite der Bündelscheidenzellen können die gebildeten Oligosaccharide nicht zurück diffundieren und verbleiben somit in den Intermediärzellen (Zhang und Turgeon, 2009; Slewinski *et al.*, 2013). Im Gegensatz zum passiven Beladungstyp zeigen Pflanzen, welche RFOs als Kohlenhydrate transportieren eine geringere Zuckerkonzentration in den Mesophyllzellen als in den Siebelementen des Phloems (Haritatos *et al.*, 1996; Voitsekhovskaja *et al.*, 2006). Typische RFO-transportierende Pflanzenfamilien sind Curcubitaceae (dt. Kürbisgewächse), Onagraceae (dt. Nachtkerzengewächse) und Oleaceae (dt. Ölbaumgewächse), zu welchen als Vertreter der

Bäume auch *Fraxinus excelsior* (dt. Gewöhnliche Esche) zählt (Öner-Sieben und Lohaus, 2014; Lü *et al.*, 2017)

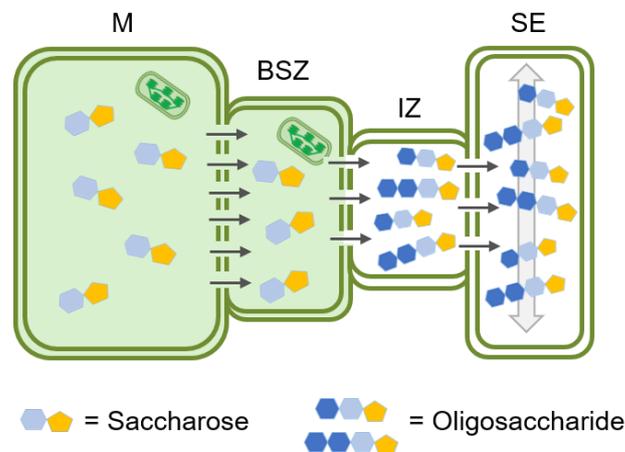


Abbildung 1.6 Aktive symplastische Phloembeladung. Saccharose gelangt von den Mesophyllzellen (M) über die Bündelscheidenzellen (BSZ) in die Intermediärzellen (IZ), wo sie in Oligosaccharide umgewandelt wird, die aufgrund ihrer Größe nicht in die Mesophyllzellen zurück diffundieren können. Von den Intermediärzellen gelangen die Oligosaccharide in die Siebelemente (SE). Abbildung basiert auf: Rennie und Turgeon, 2009; Liesche und Patrick, 2017; Zhang und Turgeon, 2018; Miras *et al.*, 2022

1.4.3 Aktive apoplastische Phloembeladung, Saccharose-Transporter und SWEETs

1.4.3.1 Apoplastische Phloembeladung

In der aktiven apoplastischen Phloembeladung sind die Mesophyllzellen symplastisch von den Geleitzellen des Phloems isoliert, sodass Saccharose hier über Transporter ins Phloem gelangt (Rennie und Turgeon, 2009). Die Saccharose wird zunächst über Transporter der SWEET-Familie (SWEET, engl. *sugars will eventually be exported transporters*) in den Apoplasten exportiert und in einem zweiten Schritt über Saccharose-Transporter (SUT, engl. *sucrose uptake transporters*) in die Geleitzellen transportiert (Abbildung 1.7) (Riesmeier *et al.*, 1992; Sauer und Stolz, 1994; Chen *et al.*, 2012). Ebenso wie bei den aktiven, symplastischen Phloembeladungstypen zeigen sich bei den aktiven, apoplastischen Phloembeladern weitaus höhere Saccharose-Konzentrationen in den Siebelementen des Phloems als in den Mesophyllzellen (Zhang und Turgeon, 2018).

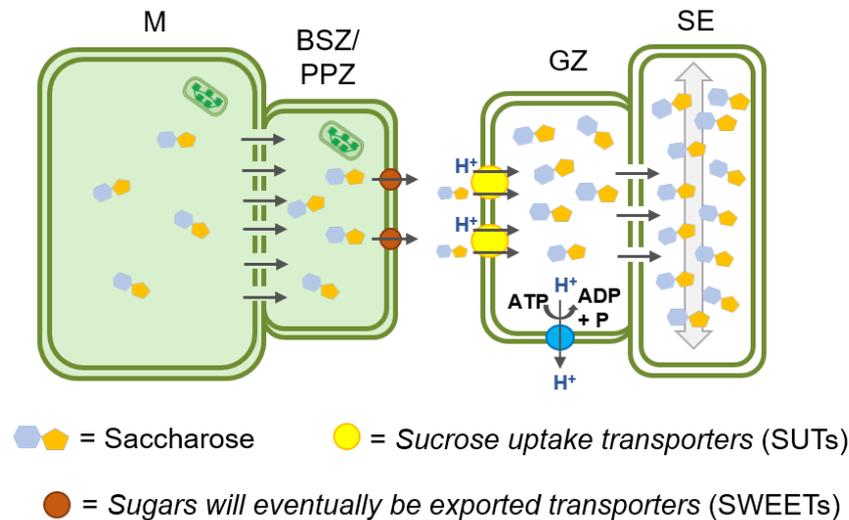


Abbildung 1.7 Aktive apoplastische Phloembeladung. Saccharose wird von den Mesophyllzellen (M) über die Bündelscheidenzellen (BSZ) bzw. Phloemparenchymzellen (PPZ) über SWEETs in den Apoplasten transportiert. Zurück in die Geleitzellen (GZ) gelangt die Saccharose über SUTs. Durch die Hydrolyse von ATP durch die H⁺/ATPase, die an der Membran der Geleitzellen lokalisiert ist, entsteht eine protonenmotorische Kraft, welche den Transport von Saccharose und Protonen (H⁺) durch SUTs zurück in den SE-CC-Komplex ermöglicht. Die Saccharose-Konzentration ist im SE-CC-Komplex höher als in den Mesophyllzellen. Abbildung basiert auf: Yadav *et al.*, 2015; Liesche und Patrick, 2017; McCubbin und Braun, 2020.

1.4.3.2 Saccharose-Transporter

Saccharose-Transporter (SUT bzw. SUC, engl. *sucrose uptake transporters* bzw. *sucrose uptake carriers*) sind aufgrund der ihnen zugeschriebenen Rolle in der Phloembeladung jedoch auch hinsichtlich anderer Funktionen in zahlreichen Studien in mono- und dikotylen Pflanzen untersucht worden (Riesmeier *et al.*, 1992; Aoki *et al.*, 2003; Knop *et al.*, 2004; Aoki *et al.*, 2004; Chincinska *et al.*, 2008; Payyavula *et al.*, 2011; Reinders *et al.*, 2012a; Peng *et al.*, 2014). SUTs gehören zu den Glucosid-Pentosid-Hexuronid-Kationen-Symportern und sind Mitglied der sog. *major facility superfamily* (MFS). Der Transport von Saccharose durch SUTs wird durch einen Protonengradienten angetrieben, wobei Saccharose und Protonen in einer 1:1 Stöchiometrie transportiert werden (Geiger, 2011). SUTs bestehen aus 12 hochkonservierten Transmembran- α -Helices, welche in zwei Blöcke bestehend aus jeweils 6 Transmembrandomänen (TMD) aufgeteilt sind. Diese beiden Blöcke sind zwischen der 6. und 7. TMD durch einen zytoplasmatischen Loop miteinander verbunden (Lemoine, 2000; Reinders *et al.*, 2002; Sun *et al.*, 2012). Anhand des SUC1 aus *Arabidopsis thaliana* (dt. Ackerschmalwand) (Sauer und Stolz, 1994) wird die Struktur von Saccharose-Transportern in der folgenden Abbildung verdeutlicht:

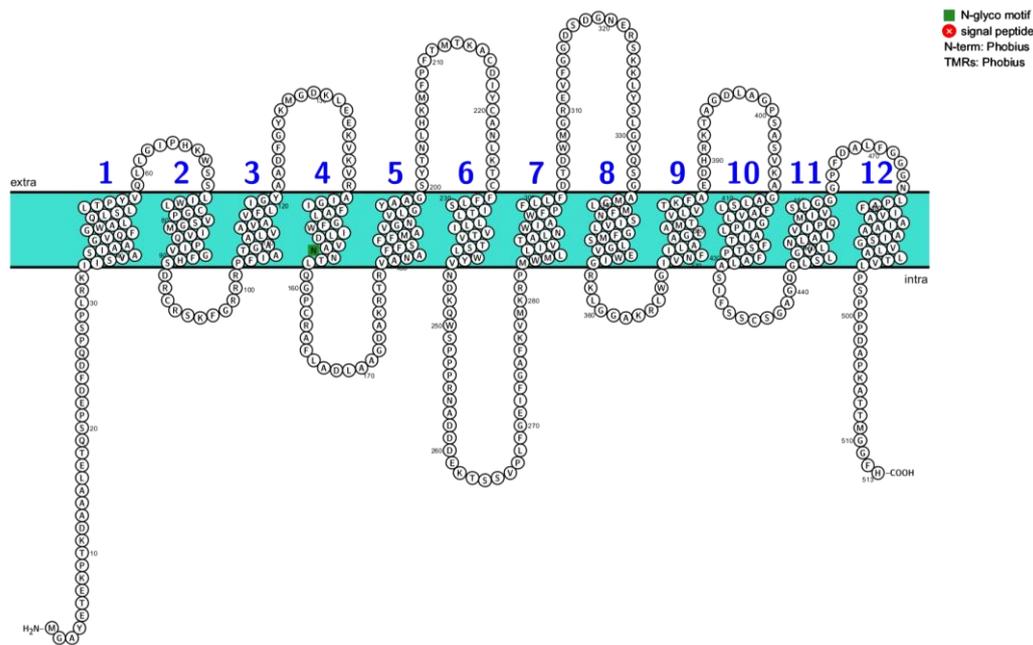


Abbildung 1.8 Struktur von Saccharose-Transportern am Beispiel des AtSUC1. Die Abbildung wurde mit Protter (Version 1.0) erstellt (Omasits *et al.*, 2014). Die Transmembrandomänen sind mit den Nummern 1 bis 12 gekennzeichnet.

Phylogenetisch lassen sich SUTs in vier Gruppen einteilen, welche aus zwei ursprünglich vorhandenen Gruppen der Transporter (AG 1 und AG 2, engl. *ancient group*) hervorgegangen sind (Peng *et al.*, 2014). Für die Einteilung von Saccharose-Transportern wurden von verschiedenen Autoren unterschiedliche Nomenklaturen verwendet (Aoki *et al.*, 2003; Sauer, 2007; Kühn und Grof, 2010; Reinders *et al.*, 2012a; Lalonde und Frommer, 2012). In dieser Arbeit werden die SUTs nach der Nomenklatur von Peng *et al.* (2014) benannt, nach welcher die SUTs in die Typen I, II, IIB und III eingeteilt werden. Erstmals wurde ein SUT des Typs I von Riesmeier *et al.* (1992) aus Spinat isoliert und hinsichtlich seiner Affinität zu Saccharose charakterisiert. Seitdem wurden in zahlreichen monokotylen und dikotylen Pflanzenfamilien Saccharose-Transporter gefunden und untersucht.

Für die Phloembeladung in dikotylen Pflanzen von besonderer Bedeutung sind die an der Plasmamembran lokalisierten SUTs des Typs I. Sie zeigten in bisherigen Untersuchungen oft eine hohe Affinität zu Saccharose mit K_m Werten zwischen 0,5 und 2 mM und konnten sowohl in der Zellmembran von Geleitzellen als auch von Siebelementen lokalisiert werden (Gahrtz *et al.*, 1996; Kühn *et al.*, 1997; Barker *et al.*, 2000). SUTs des Typs I sind jedoch nicht nur in *source*-Gewebe am Saccharose-Transport beteiligt, sondern ebenso in *sink*-Gewebe. So wurden sie beispielsweise auch im Pollen von *Arabidopsis thaliana* (Stadler *et al.*, 1999) und *Plantago major* (dt. Breitwegerich) (Lauterbach *et al.*, 2007) lokalisiert.

Typ II SUTs sind im Gegensatz zu SUTs des Typs I sowohl in dikotylen als auch in monokotylen Pflanzen vorhanden. Dabei übernehmen die SUTs des sog. Typs IIB in Monokotyledonen die Funktion der Typ I-SUTs in Dikotyledonen und somit die Phloembeladung (Matsukura *et al.*, 2000). Es wird jedoch auch eine Funktion von SUTs des Typs II in *sink*-Geweben, wie beispielsweise bei der Ausbildung des Pollenschlauchs diskutiert (Barth *et al.*, 2003; Hackel *et al.*, 2006). Hinsichtlich ihrer Affinität zu Saccharose zeigten Typ-II-SUTs höhere K_m -Werte verglichen mit Typ-I-SUTs (Schulze *et al.*, 2000; Barth *et al.*, 2003). Auch strukturell unterscheiden sie sich sowohl von Typ-I- als auch von Typ III-Saccharose-Transportern. Sie besitzen einen verlängerten zytoplasmatischen Loop und einen längeren N-Terminus. Eine weitere Auffälligkeit der Saccharose-Transporter des Typs II in verschiedenen Laub- und Nadelbaumarten zeigt sich hinsichtlich des Einflusses verschiedener Umweltbedingungen auf ihre Expression. So scheinen jahreszeitliche Veränderungen der Temperatur oder auch der Lichtverhältnisse auf die Pflanzen keinen bzw. nur einen geringen Einfluss auf die Expression der Typ-II SUTs zu haben (Dobbelstein *et al.*, 2019; Han *et al.*, 2022). Es ist davon auszugehen, dass diese SUTs neben einer möglichen Beteiligung an der Rückgewinnung von Saccharose ins Phloem auch basale Funktionen in Bäumen wahrnehmen.

SUTs vom Typ III sind sowohl in mono- als auch in dikotylen Pflanzen vorhanden. Im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen SUTs des Typs II herrscht die Funktion der Typ-III-Transporter betreffend eine größere Einigkeit: aufgrund ihrer Lokalisation an der Membran der Vakuole, dem Tonoplasten, scheint es naheliegend, dass diese SUTs für den Transport von Saccharose aus der Vakuole ins Zytoplasma zuständig sind (Getz und Klein, 1995; Endler *et al.*, 2006; Frost *et al.*, 2012; Schneider *et al.*, 2012).

1.4.3.3 SWEETs

In der apoplastischen Phloembeladung sind neben SUTs die sog. „SWEETs“ als Transporter für Saccharose beteiligt (Abs. 1.4.3.1). Sie sind dabei für den Transport von Saccharose aus den Mesophyllzellen in den Apoplasten verantwortlich und somit für den Schritt vor der eigentlichen Phloembeladung durch SUTs (Chen, 2014; Eom *et al.*, 2015).

SWEETs gehören zu den Uniportern und bestehen aus 7 Transmembrandomänen. Sie wurden nicht nur in Pflanzen identifiziert, sondern ebenso im tierischen und menschlichen Organismus (Chen *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2021). Phylogenetisch können SWEETs in Angiospermen in 4 Kladen eingeteilt werden. Auffällig ist, dass Transporter, welche zu den SWEETs gehören, in weitaus höherer Anzahl in Pflanzen vorkommen als SUTs. So wurden z.B. in *Arabidopsis thaliana* 17 (Chen *et al.*, 2012), in *Oryza sativa* (dt. Reis) 21 (Yuan und Wang, 2013) oder in

Malus domestica (dt. Kulturapfel) 33 (Wei *et al.*, 2014) Transporter der SWEET-Familie identifiziert. Im Genom der Pappel-Art *Populus trichocarpa* (dt. Westliche Balsam-Pappel) konnten (Zhang *et al.*, 2021) 27 Mitglieder der SWEET-Familie identifizieren. Inwiefern sich diese zahlreichen SWEETs in den einzelnen Arten bezüglich ihrer Funktionen in der Pflanze unterscheiden, ist in vielen Fällen nicht geklärt. Jedoch können entsprechend der Klade, in welche sie in der phylogenetischen Analyse clustern, Vorhersagen über die Reaktionen getroffen werden, an welchen die Transporter beteiligt sein könnten. So sind in *Arabidopsis thaliana* die SWEETs der Klade I (Sweet 1 – 2), II (SWEET 2 – 8) und IV (SWEET 16 – 17) überwiegend Monosaccharid-Transporter. Die SWEETs der Klade III (SWEET 9 – 15 in *A. thaliana*) transportieren hingegen vor allem Saccharose und sind somit beispielsweise an der Nektar-Sekretion sowie an der Phloembeladung beteiligt (Breia *et al.*, 2021).

1.5 Phloembeladung in Nadelblättern

Die meisten Studien zur Phloembeladung wurden mit Blättern von Angiospermen durchgeführt. Verglichen mit diesen weisen die Blätter bzw. Nadeln von Gymnospermen eine komplexere Anatomie auf. So besteht der *pre-phloem pathway* aus 4 verschiedenen Zelltypen: die in den Mesophyllzellen produzierte Saccharose gelangt über die Endodermis ins Transfusionsparenchym, welches aus toten Transfusionstracheiden sowie lebenden Transfusionsparenchymzellen besteht. Zusammen mit den Strasburger Zellen, welche die Funktionen der Geleitzellen in Angiospermen wahrnehmen, bilden die lebenden Zellen des Transfusionsparenchyms die Verbindung zwischen der Endodermis sowie den Siebzellen des Phloems (Canny, 1993; Liesche *et al.*, 2011). Die Endodermis erfüllt weitestgehend die Funktion der Bündelscheidenzellen in den Blättern von Angiospermen, jedoch mit dem Unterschied, dass sich zwischen den Zellen der Endodermis ein Casparischer Streifen oder andere Zellwandmodifikationen befinden. Somit scheinen Wasser sowie Mineralstoffe und Photoassimilate überwiegend symplastisch in die lebenden Zellen des Transfusionsgewebes zu gelangen. Die Funktion der Endodermis bzw. des Casparischen Streifens ist in Gymnospermen-Blättern weitestgehend unbekannt, es scheint jedoch, dass sie eine größere Permeabilität für gelöste Nährstoffe aufweist als die Endodermis, die in Wurzeln vorhanden ist (Wu *et al.*, 2005; Stegner *et al.*, 2023).

Eine schematische Übersicht über den *pre-phloem pathway* von Saccharose in Gymnospermen zeigt die folgende Abbildung:

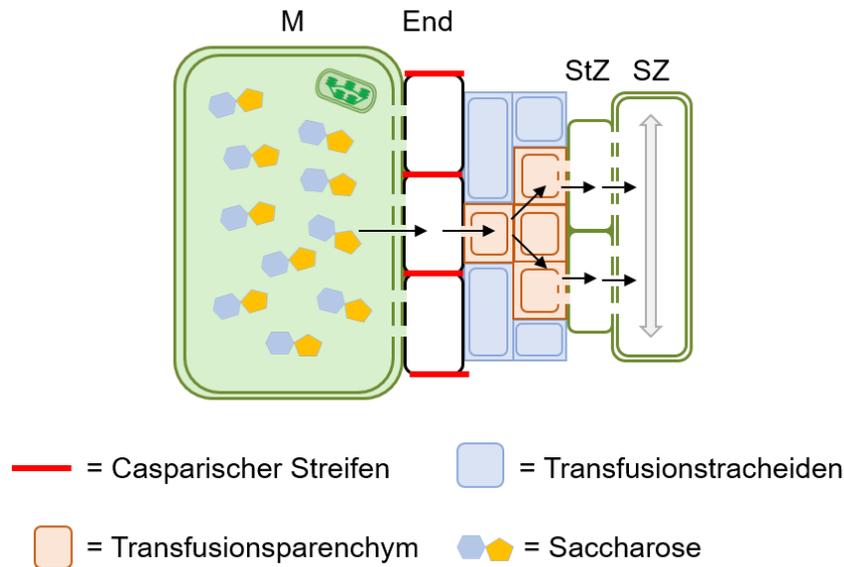


Abbildung 1.9 Schematische Darstellung des *pre-phloem-pathways* in Gymnospermen. Die in den Mesophyllzellen (M) gebildeten Saccharose passiert symplastisch die Endodermis (End) und gelangt in die lebenden Zellen des Transfusionsparenchyms. Über die dort angrenzenden Strasburger-Zellen (StZ) gelangt die Saccharose in die Siebzellen (SZ) des Phloems und wird von dort aus in der Pflanze verteilt. Abbildung basiert auf: Liesche *et al.*, 2011; Liesche und Schulz, 2013

Untersuchungen der symplastischen Verbindungen der Zellen des *pre-phloem pathways* in den Blättern von *Picea abies* sowie *Pinus sylvestris* (dt. Waldkiefer) zeigten, dass die Zellen der Endodermis, des Transfusionsparenchyms sowie den Strasburger Zellen durch zahlreiche Plasmodesmen miteinander verbunden sind (Liesche *et al.*, 2011; Fink, 2019). Liesche und Schulz (2012) zeigten zudem, dass die Zuckerkonzentrationen und damit einhergehend die Osmolalität des Blattsaftes in den Nadeln von *Pinus sylvestris* etwas höher liegen als in Blättern von Angiospermen. Die Beobachtungen deuten auf einen passiven Beladungsmechanismus des Phloems in Koniferen-Nadeln hin.

2. Fragestellung

Saccharose ist in den meisten Pflanzen die Haupttransportform von Kohlenhydraten. Die kontrollierte Verteilung von Saccharose im Phloem ausgehend von den *source*-Organen bis zu den *sink*-Organen ist ein wichtiger Faktor für die Entwicklung und das Überleben von Pflanzen. Den ersten Schritt für die effiziente Verteilung von Saccharose stellt die Phloembeladung dar. Während diese in vielen krautigen Pflanzen gut erforscht wurde, ist in den größten Vertretern im Pflanzenreich, den Bäumen, verhältnismäßig wenig über den Mechanismus der Phloembeladung bekannt. Aufgrund ihres hohen Zuckergehaltes in den Blättern und der offenen *minor vein*-Anatomie wurde für Bäume ein passiver Beladungsmechanismus durch Diffusion angenommen. Allerdings weisen jüngere Untersuchungen auf das Vorhandensein aktiver Schritte in der Phloembeladung hin, in welche Saccharose-Transporter involviert sind.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Phloembeladung in den europäischen Baumarten *Fagus sylvatica*, *Quercus robur* und *Picea abies* untersucht werden. Die bisherigen Untersuchungen zu dieser Thematik in den genannten Arten wurden mit kleinen Bäumen (5 Jahre alt) durchgeführt, die im Gewächshaus gehalten wurden. Der Fokus der vorliegenden Arbeit lag darauf, den Mechanismus der Phloembeladung in hohen, ausgewachsenen Bäumen zu analysieren. Die Untersuchung der Fragestellung erfolgte in zwei Teilschritten:

1. Wie sind Kohlenhydrate in verschiedenen pflanzlichen Organen kleiner und hoher Bäume verteilt?

Um die Phloembeladung in hohen Bäumen zu untersuchen, sollten zunächst die NSC-Gehalte (engl. *non-structural-carbohydrates*), zu denen Zucker und Stärke zählen, von kleinen Bäumen (2 m Höhe) im Vergleich zu hohen Bäumen (11 – 26 m Höhe) der ausgewählten Arten analysiert werden. In den Mesophyllzellen von Blättern der beiden Laubbäume *F. sylvatica* und *Q. robur* sollte zudem die subzelluläre Verteilung von Saccharose und Hexosen zwischen dem Zytosol, der Vakuole sowie den Chloroplasten betrachtet werden.

Die genannten Analysen ermöglichen es, die Speicherung sowie den Transport von Kohlenstoffverbindungen, insbesondere Saccharose, zu verstehen.

2. Welche Rolle spielen Saccharose-Transporter bei der Phloembeladung in den ausgewählten Baumarten?

Der erste Schritt für die Beantwortung dieser Fragen war die Vervollständigung der bereits gefundenen Saccharose-Transporter-Sequenzen in *F. sylvatica*. Hier war die vollständige Sequenz für das Protein des SUTs vom Typ I vorhanden, für die SUTs der Typen II und III

waren lediglich kurze Teilsequenzen bekannt. Um auch die Funktionen dieser SUTs untersuchen zu können, war es nötig, die Sequenzen der genannten Transporter zu vervollständigen.

Im Rahmen der Untersuchung von SUTs kleiner und hoher Bäume wurde die Expression der Transporter in Abhängigkeit von der Wachstumshöhe bzw. dem Alter der Bäume analysiert. Über diese Betrachtungen ist es möglich, Rückschlüsse auf einen eventuell anderen Beladungsmechanismus des Phloems sowie mögliche weitere Funktionen von SUTs in hohen Bäumen zu ziehen.

Die Analyse der Funktionalität der SUTs stellt einen wichtigen Parameter für ihre Charakterisierung dar und lässt erste Aussagen über ihre Funktionen in den entsprechenden Pflanzenarten zu. Mit diesen Untersuchungen sollte eruiert werden, ob die Transporter Saccharose aufnehmen und transportieren können. Eine weitere Möglichkeit, Aussagen zu den spezifischen Funktionen von SUTs in den Pflanzen treffen zu können, ist, diese im Gewebe verschiedener Organe zu lokalisieren. Daher bestand eine weitere Aufgabe in diesem Teil der Fragestellung darin, zu untersuchen, in welchen Zellen ausgewählter Pflanzengewebe die SUTs aus *F. sylvatica*, *Q. robur* und *P. abies* exprimiert werden. Darüber hinaus sollte die Lokalisation der SUTs aus *F. sylvatica* und *Q. robur* intrazellulär in pflanzlichen Protoplasten erfolgen. Diese Untersuchungen sind insbesondere für die SUTs des Typs III von Bedeutung. Typ III-SUTs sind in vielen krautigen und auch holzigen Pflanzen im Tonoplasten der Vakuole lokalisiert und können dort über die Expression in pflanzlichen Protoplasten sichtbar gemacht werden.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Pflanzenmaterial

Der überwiegende Teil des in dieser Arbeit verwendeten Pflanzenmaterials stammt von europäischen Laub- und Nadelbäumen. Die untersuchten Arten sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Tabelle 3.1 Baumarten

| Wissenschaftlicher Name | Deutscher Name | Familie | Erstbestimmung |
|-----------------------------------|----------------|----------|-----------------|
| <i>Fagus sylvatica</i> L. | Rotbuche | Fagaceae | Carl von Linné |
| <i>Quercus robur</i> L. | Stieleiche | Fagaceae | Carl von Linné |
| <i>Picea abies</i> (L.) H. Karst. | Gemeine Fichte | Pinaceae | Hermann Karsten |

Das Pflanzenmaterial für die Untersuchung der Höhengradienten stammt von Standorten in Niedersachsen und Nordrhein-Westfalen. Die Proben von *Q. robur* stammen von kleinen und hohen Bäumen auf dem bewaldeten Gelände der Bergischen Universität Wuppertal (Nordrhein-Westfalen, 51° 14' N, 7° 8' O). Für *F. sylvatica* und *P. abies* wurden kleine und hohe Bäume in einem Waldgebiet im Solling (Niedersachsen, 51° 44' N, 9° 36' O) beprobt.

Für die Untersuchung der Lokalisation von SUTs in den drei Baumarten wurden Proben von Blättern bzw. Nadeln, Rinde und Holz verwendet. Zudem wurden von *F. sylvatica* weibliche Früchte zum Zeitpunkt der Samenreifung gesammelt. Alle Proben für die Lokalisationsuntersuchungen wurden auf dem Gelände der Bergischen Universität Wuppertal gesammelt und stammen von kleinen, ca. 5 Jahre alten Setzlingen, welche in einem offenen Gewächshaus gehalten wurden sowie von hohen Bäumen, die sich auf dem bewaldeten Gelände der Universität befinden. Im offenen Gewächshaus unterliegen die Baumsetzlinge ebenfalls jahreszeitlich bedingten klimatischen Veränderungen.

Für die Isolation von Protoplasten wurden vier bis sechs Wochen alte Pflanzen von *Arabidopsis thaliana* des Stammes *Columbia-0* (Abk. *Col-0*) verwendet. Für die Anzucht wurden die Pflanzensamen auf angefeuchteter Erde in Anzuchttöpfen mit Deckel ausgesät und regelmäßig bewässert. Die Pflanzen wurden in einem geschlossenen Gewächshaus unter Langtagbedingungen angezogen (Belichtungsdauer: 16 h).

3.1.2 Bakterien- und Hefestämme

Für die Klonierungsarbeiten wurde der Bakterienstamm *E. coli* DH5 α verwendet (Woodcock *et al.*, 1989).

Genotyp: F⁻ ϕ 80*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*) U169 *recA1 endA1 hsdR17*(r_k⁻, m_k⁺) *gal⁻ phoA supE44 λ thi⁻1 gyrA96 relA1*

Für die Funktionsüberprüfung und Expression von ausgewählten SUTs in Hefe wurde der Hefestamm SEY2102 (Emr *et al.*, 1983) verwendet.

Genotyp: *MAT α , ura3, leu2, his4, suc2- Δ 9*

3.1.3 Geräte, Chemikalien und Lösungen

Eine detaillierte Liste aller verwendeten Geräte und Chemikalien befindet sich im Anhang

Alle verwendeten Puffer und Lösungen wurden, sofern nicht anders angegeben, in Reinstwasser angesetzt. Dieses wurde aus VE-Wasser über ein Reinstwasser-Aufbereitungssystem der Firma Millipore (Typ MilliQ[®] Academic) hergestellt.

3.1.4 Kits und Enzyme

Die für die Aufreinigung von Nukleinsäuren wie PCR-Produkten oder Plasmiden verwendeten Kits sind in Tabelle 3.2 aufgeführt.

Tabelle 3.2 Kits für die Nukleinsäureaufreinigung

| Name | Verwendungszweck | Hersteller |
|---|---------------------------------------|-------------------|
| GeneJET Gel Extraxtion Kit | DNA-Isolation aus Agarosegelen | Thermo Scientific |
| GeneJET Plasmid Miniprep Kit | Plasmidpräparation aus <i>E. coli</i> | Thermo Scientific |
| GeneJET PCR Purification Kit | Aufreinigung von DNA | Thermo Scientific |
| PureLink [™] HiPure Plasmid Midiprep Kit | Plasmidpräparation aus <i>E. coli</i> | Invitrogen |
| RevertAid [™] First Strand cDNA Synthesis Kit | Synthese von cDNA aus mRNA | Thermo Scientific |
| Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2x) with ROX | qPCR | Thermo Scientific |

Sonstige, für molekularbiologische Arbeiten verwendeten Kits und Enzyme sind in Tabelle 3.3 aufgeführt.

Tabelle 3.3 Kits und Enzyme für molekularbiologische Arbeiten

| Name | Verwendungszweck | Hersteller |
|--|----------------------------------|---------------------|
| RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit | Synthese von cDNA aus mRNA | Thermo Scientific |
| Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2x) with ROX | qPCR | Thermo Scientific |
| <i>Taq</i> -Polymerase | PCR | Roth |
| Q5-Polymerase | | New England Biolabs |
| Phusion-Polymerase | | Thermo Scientific |
| Pfu-Polymerase | | Roth |
| DNase I | DNA-Verdau vor cDNA- Synthese | Thermo Scientific |
| <i>BsmBI</i> | Klonierung | New England Biolabs |
| <i>EcoRI</i> | | |
| <i>NcoI</i> | | |
| <i>NdeI</i> | | |
| <i>NotI</i> | | |
| <i>PciI</i> | | |
| <i>SpeI</i> | | |

Die Verwendung der Kits erfolgte jeweils nach Herstellerangaben.

3.1.5 Plasmide

Die folgende Tabelle zeigt die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide. Die entsprechenden Plasmidkarten sind im Anhang aufgeführt.

Tabelle 3.4 Plasmide

| Name | Selektionsmarker | Quelle |
|--------------|------------------|--------------------------------|
| pGEM T easy® | Ampicillin, lacZ | Fa. Promega |
| pNEV-N | Ampicillin, URA3 | Sauer und Stolz, 1994 |
| pSS87 | Ampicillin | Schneider <i>et al.</i> , 2012 |
| pCS120 | Ampicillin | Dotzauer <i>et al.</i> , 2010 |

3.1.6 Oligonukleotide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide bzw. PCR-Primer wurden von der Firma Eurofins Genomics in Ebersberg, Bayern bezogen. Eine vollständige Liste der Oligonukleotide befindet sich im Anhang.

Die Stocklösungen der Oligonukleotide besaßen jeweils Konzentrationen von 100 pmol/µl. Für die PCR-Reaktionen wurden die Primer im Verhältnis 1:10 auf eine Konzentration der Gebrauchslösungen von 10 pmol/µl mit Nuklease-freiem Wasser (Fa. Thermo Fisher) verdünnt.

3.1.7 Sequenzierungen

Die in dieser Arbeit generierten PCR-Produkte bzw. Plasmide wurden über Sanger-Sequenzierungen verifiziert. Die Produkte wurden hierfür durch Kits (siehe Tabelle 3.2) aufgereinigt und zum Sequenzieren an die Firmen Microsynth Seqlab GmbH nach Göttingen oder Eurofins Genomics nach Köln geschickt.

3.2 Probennahme und Probenaufarbeitung

Für die Entnahme der Proben wurden hohe Bäume sowie kleine Bäume von *F. sylvatica*, *Q. robur* sowie *P. abies* ausgewählt. Die Probenentnahme der hohen Bäume erfolgte für *F. sylvatica* in 26 m Höhe, für *P. abies* in 24 m Höhe sowie in *Q. robur* in 11 m Höhe. Dabei wiesen die beprobten Bäume eine Gesamthöhe von ca. 30 m (*F. sylvatica*), 27 m (*P. abies*) und 13 m (*Q. robur*) auf. Die kleinen Bäume wurden in 2 m Höhe beprobt und wiesen eine Gesamthöhe von ca. 2,5 m auf. Die Probennahme erfolgte stets zur gleichen Tageszeit (13 bis 14 Uhr), um zirkadiane Effekte auf die SUT-Expression sowie die Zucker- und Stärkekonzentrationen in den Pflanzen zu minimieren. Zunächst wurden belaubte Zweige von den Bäumen geschnitten und sofort in Blätter bzw. Nadeln, Rinde sowie Holz mithilfe eines Skalpellens separiert. Danach wurden die separierten Proben für den Transport auf Trockeneis gelagert und bei -80°C bis zur weiteren Aufarbeitung gelagert. Die auf diese Weise entnommenen Proben wurden im Folgenden auf die Expression der SUTs sowie für die Bestimmung von Zuckern, Stärke und anorganischen Ionen verwendet. Die Probennahme erfolgte erstmals im Juni 2020 und wurde im Juni 2021 wiederholt.

Für die Bestimmung der subzellulären Zuckerkonzentrationen in den Mesophyllzellen der Blätter wurden zusätzliche Blattproben von *Q. robur* und *F. sylvatica* der hohen Bäume in 11 bzw. 26 m Höhe gesammelt. Diese Proben wurden ebenfalls für den Transport auf Trockeneis gelagert und bis zu ihrer Aufarbeitung bei -80°C gelagert.

Für die Durchführung sämtlicher Methoden wurden die gefrorenen Proben mit einer Kugelmühle in Flüssigstickstoff zu einem feinen Pulver gemahlen, in Reaktionsgefäße (RG) abgefüllt und für die weiteren Aufarbeitungen bei -80°C eingefroren.

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 Agarose-Gelelektrophorese

Für die Überprüfung des Erfolges der RNA-Isolationen und von Polymerase-Kettenreaktionen sowie für die Auftrennung sonstiger DNA- und RNA-Fragmente wurde die Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt, wobei Nucleinsäuren nach ihrer Größe aufgetrennt werden (Adkins und Burmeister, 1996). Je nach Größe der zu trennenden Fragmenten wurden für die Herstellung der Gele Lösungen mit unterschiedlichen Agarose-Konzentrationen in 1xTAE-Puffer angesetzt. Für Fragmente, die eine Länge von weniger als 500 Basen besaßen, wurden 2%ige Agarosegele verwendet. Nucleinsäurefragmente, die länger als 500 Basen waren, wurden auf 1%igen Gelen überprüft. Die Elektrophorese wurde bei 120 V und 500 mA in 1x TAE-Puffer durchgeführt. Die Proben wurden dafür mit einem Ladepuffer versetzt (Tabelle 3.5). Auf jedem Gel wurde zur Abschätzung der Größe der Nucleinsäurefragmente der Größenstandard GeneRuler1kB Plus (Fa. Thermo Fisher Scientific) zusätzlich zu den Proben aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurde das Agarose-Gel in Ethidiumbromid (0,01 % v/v) gefärbt.

Die für die Gelelektrophorese verwendeten Lösungen und Probenpuffer sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Tabelle 3.5 Puffer für die Gelelektrophorese

| Puffer | Komponenten |
|--|--|
| 50x TAE-Puffer (Gebrauchslösung: 1xTAE) | 2M TRIS 1M Essigsäure (konz.) 50mM EDTA (pH 8,0) |
| RNA-Ladepuffer für die Gelelektrophorese | 95 % deionisiertes Formamid 0,025 % Bromphenolblau 0,5 mM EDTA pH 8 0,025 % SDS |
| DNA-Ladepuffer für die Gelelektrophorese | 0,2 % OrangeG 30 % Glycerin |
| Färbelösung | 0,01 % Ethidiumbromid |

3.3.2 RNA-Isolierung

Die Isolierung von RNA wurde nach einem modifizierten Protokoll von Chang *et al.* (1993) durchgeführt. Vor der Isolierung wurden der Arbeitsplatz sowie die verwendeten Pipetten mit RNase Away® (Fa. Molecular Bioproducts) gereinigt. Für sämtliche Arbeiten mit RNA wurden doppelt autoklavierte Spitzen verwendet. Zudem wurden alle Puffer und Lösungen mit DEPC-Wasser (0,1 % v/v) angesetzt.

Zunächst wurden zu ca. 200 mg Pflanzenmaterial 800 µl der auf 65°C vorgewärmte CTAB-Puffer sowie 16 µl Mercaptoethanol gegeben und inkubiert (1000 rpm, 65°C, 15 min). Anschließend wurden die Proben mit 800 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) versetzt, ca. 1 min gevortext und zentrifugiert (13000 rpm, RT, 5 min). Die obere Phase wurde entnommen und in ein frisches RG überführt. Das Auswaschen der oberen Phase mit Chloroform/Isoamylalkohol und anschließender Zentrifugation wurde zweimal wiederholt. Die Fällung der RNA erfolgte mit 10 M LiCl. Hierfür wurde zunächst das Volumen der letzten entnommenen oberen wässrigen Phase aus der Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion bestimmt, das ¼-fache dieses Volumens an 10 M LiCl hinzugegeben und invertiert. Die Fällung erfolgte über Nacht für mindestens 12 h auf Eis. Am zweiten Tag der RNA-Isolierung wurden die Proben zunächst zentrifugiert (13000 rpm, 4°C, 20 min), mit 400 µl SSTE-Puffer versetzt und inkubiert (850 rpm, 42°C, 10 min). Anschließend erfolgte erneut eine Extraktion mit 800 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1), welche einmal wiederholt wurde. Von der entnommenen oberen wässrigen Phase wurde erneut das Volumen bestimmt und das doppelte dieses Volumens an Ethanol (96 %) zugegeben. Die Fällung der RNA erfolgte 1 h bei -80°C. Die RNA wurde anschließend durch Zentrifugation (13000 rpm, 4°C, 20 min) pelletiert, das Pellet mit 500 µl 70%igem Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (13000 rpm, 4°C, 10 min). Das Ethanol wurde vollständig abgenommen, das RNA-Pellet bei 42°C getrocknet und anschließend in 39 µl DEPC-Wasser gelöst (850 rpm, 42°C, 10 min).

Die Integrität der isolierten RNA wurde sowohl über eine Agarose-Gelelektrophorese als auch über eine photometrische Messung bestimmt. Zusätzlich wurde die Konzentration der RNA photometrisch am Nanodrop® bestimmt. Die Isolation galt als erfolgreich, wenn das Verhältnis der Wellenlängen 260 nm zu 280 nm Werte zwischen 2,0 und 2,2 aufwies. Die Lagerung der RNA erfolgte bei -80°C.

Tabelle 3.6 Puffer für die RNA-Isolierung

| Puffer | Komponenten |
|---------------|---|
| CTAB-Puffer | 2 % CTAB 100 mM TRIS 25 mM EDTA 2M NaCl 2 % PVP |
| SSTE-Puffer | 0,5 % SDS 10 mM TRIS 1 mM EDTA 1M NaCl |

3.3.3 DNase-Verdau und cDNA-Synthese

Vor dem Umschrieb der RNA in cDNA wurde ein Verdau von 2 µg RNA mit DNase I (Fa. Thermo Fisher Scientific) bei 37°C für 15 min durchgeführt, um eventuell zusätzlich isolierte DNA zu entfernen. Der Verdau wurde mit 10 mM EDTA gestoppt (65°C, 10 min).

Die Synthese der cDNA aus der verdauten RNA erfolgte mit dem RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (Fa. Thermo Fisher Scientific). Zunächst wurde die verdaute RNA mit einem Oligo(dT)₁₈-Primer inkubiert (65°C, 5 min). Anschließend erfolgte der Umschrieb in cDNA nach Zugabe von Reaktionspuffer, RNase-Inhibitor, dNTP-Mix sowie reverser Transkriptase (42°C, 60 min). Die Aktivität der reversen Transkriptase wurde anschließend durch Erhitzen des Reaktionsansatzes gestoppt (5 min, 70°C). Die Durchführung erfolgte nach Kitanweisungen.

Die cDNA wurde im Verhältnis 1:10 (v/v) mit Reinstwasser verdünnt und für alle weiteren Untersuchungen bei -20°C gelagert.

3.3.4 Primerdesign

Für das Design spezifischer Primer für die PCR wurden sowohl der Webserver *Primer 3* als auch die Software *Perl Primer* verwendet. Für die Vervielfältigung von DNA-Fragmenten von Saccharose-Transportern wurden die Primer aus der vollständigen cDNA-Sequenz abgeleitet. Für Primer der *housekeeping*-Gene (HKG) für qPCR-Messungen wurden bereits publizierte Primersequenzen verwendet. Eine vollständige Liste aller verwendeten Primer befindet sich im Anhang.

3.3.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion ermöglicht es, gezielt DNA-Fragmente mithilfe einer Polymerase und spezifischen Primern zu isolieren und zu vervielfältigen (Mullis *et al.*, 1986).

In dieser Arbeit wurde mit verschiedenen Polymerasen gearbeitet. Die Funktionalität der designten Primer (Abs. 3.3.4) wurde mit der *Taq*-Polymerase überprüft (Tabelle 3.7). Für jedes Primerpaar wurden vier Temperaturen mit einer Differenz von 2°C zwischen den *Annealing*-Temperaturen getestet.

Tabelle 3.7 PCR-Programm: *Taq*-Polymerase

| Komponente | Volumen [μ l] | PCR-Programm | Zyklen |
|---|--------------------|--|--------|
| 10x Puffer mit MgCl ₂ | 2,5 | 94°C, 3 min (Initialdenaturierung) | 1 x |
| Reinstwasser | 17,7 | | |
| dNTPs (10 mM) | 0,5 | 94°C, 30 s (Denaturierung) 50 – 65* °C, 30 s (Primer-Annealing) 72°C, [x]** s (Elongation) | 40 x |
| <i>forward</i> -Primer (10 pmol/ μ l) | 0,5 | | |
| <i>reverse</i> -Primer (10 pmol/ μ l) | 0,5 | | |
| Polymerase (5 U/ μ l) | 0,3 | 72°C, 3-10 min*** (finale Elongation) | 1 x |
| Template DNA | 3 (cDNA) | | |

[*] = Annealing-Temperatur für spezifische Primerpaare, [**] = Elongationszeit abhängig von der Länge des PCR-Produktes (*Taq*-Polymerase: 1000 Basen/min), [***] = abhängig von der Länge des PCR-Produktes

Sofern die aus der PCR gewonnene DNA für weitere Untersuchungen weitergenutzt wurde, für welche sequenzexakte PCR-Produkte vorausgesetzt sind, kamen Polymerasen mit *proof-reading*-Funktion zum Einsatz. Diese bauen bei der Verlängerung eines DNA-Stranges weniger fehlerhafte Basen ein als die *Taq*-Polymerase. In dieser Arbeit wurden verschiedene *proof-reading*-Polymerasen verwendet. Die entsprechenden PCR-Programme sowie die Zusammensetzungen der PCR-Ansätze sind in Tabelle 3.8 und Tabelle 3.9 zusammengefasst.

Tabelle 3.8 PCR-Programm: *Phusion*- und *Q5*-Polymerase

| Komponente | Volumen [μ l] | PCR-Programm | Zyklen |
|------------------------------|--|--------------------------------------|--------|
| 5x Puffer | 5 | 98°C, 30-45 s (Initialdenaturierung) | 1 x |
| Reinstwasser | 11,8 | | |
| dNTPs (10 mM) | 0,5 | 98°C, 10 s (Denaturierung) | 45 x |
| <i>forward</i> -Primer | 1,2 | 50 – 65* °C, 30 s (Primer-Annealing) | |
| <i>reverse</i> -Primer | 1,2 | 72°C, [x]** s (Elongation) | |
| Polymerase (2 U/ μ l) | 0,3 | 72°C, 3-5 min*** (finale Elongation) | 1 x |
| Template DNA | 5 (cDNA) 0,5-1 (Plasmid- DNA) | | |

[*] = $T_{a(\text{Phusion/Q5})} = T_{a(\text{Taq})} + 3^\circ\text{C}$; [**] = Elongationszeit abhängig von der Länge des PCR-Produktes (*Phusion/Q5*-Polymerase: 2000 Basen/min), [***] = abhängig von der Länge des PCR-Produktes

Tabelle 3.9 PCR-Programm: *Pfu*-Polymerase

| Komponente | Volumen [μ l] | PCR-Programm | Zyklen |
|--|--|---|--------|
| 10x Puffer | 2,5 | 95°C, 2 min (Initialdenaturierung) | 1 x |
| Reinstwasser | 15,6 | | |
| dNTPs (10 mM) | 0,5 | 95°C, 20 s (Denaturierung) 50-65* °C, 30 s (Primer-Annealing) 72°C, [x]**min (Elongation) | 35 x |
| <i>forward</i> -Primer (10 pmol/ μ l) | 0,5 | | |
| <i>reverse</i> -Primer (10 pmol/ μ l) | 0,5 | | |
| Polymerase (5 U/ μ l) | 0,4 | 72°C, 10-15 min*** (finale Elongation) | 1 x |
| Template DNA | 5 (cDNA) 0,5-1 (Plasmid- DNA) | | |

[*] = $T_{a(\text{Pfu})} = T_{a(\text{Taq})} + 3^\circ\text{C}$; [**] = Elongationszeit abhängig von der Länge des PCR-Produktes (*Pfu*-Polymerase: 500 Basen/min), [***] = abhängig von der Länge des PCR-Produktes

3.3.6 Quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR)

Mit der quantitativen Echtzeit-PCR kann DNA quantifiziert werden. Die qRT-PCR dient der Quantifizierung von mRNA, welche durch eine Reaktion mit reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben werden kann. Die cDNA dient dann als Template für die qRT-PCR (siehe Abs. 3.3.3). Der Verlauf der PCR wird hierbei über die gesamte Laufzeit überwacht (Freeman *et al.*, 1999). In dieser Arbeit wurde die qRT-PCR für die Untersuchung der Expression von SUTs verwendet. Die Quantifizierung des *gene of interest* (Abk.: GOI) erfolgte in dieser Arbeit relativ zu einem *housekeeping*-Gen. Diese Gene kodieren für Proteine, die grundlegende Funktionen in der Zelle erfüllen und während der Transkription in der Zelle keiner Regulation unterliegen, weswegen sie auf einem konstanten Level exprimiert werden (Pfaffl, 2001; Dheda *et al.*, 2004; Hounkpe *et al.*, 2021). Der Endpunkt der Quantifizierung ist der sog. C_t -Wert (engl.: *cycle threshold*). Er ist definiert als der Wert, an dem das Fluoreszenzsignal des Reporter-Farbstoffs einen festgelegten Schwellenwert überschreitet, ab welchem sich die PCR in jedem Fall in der exponentiellen Phase befindet (Schmittgen und Livak, 2008). Als Farbstoff für die Messung des Fluoreszenzsignals wurde SYBR-Green verwendet, welches an doppelsträngige DNA bindet (Zipper *et al.*, 2004). Die Fluoreszenz wird nach der Elongation gemessen. Als Referenzfarbstoff wurde ROX eingesetzt. Dieser Farbstoff bindet im Gegensatz zum SYBR-Green nicht an DNA und wird für Normalisierung des Signals ausgehend vom SYBR-Green eingesetzt. Durch die Zugabe von ROX werden Schwankungen im Fluoreszenzsignal, wie sie beispielsweise durch minimale Volumenunterschiede in den einzelnen Reaktionsgefäßen entstehen können, minimiert bzw. eliminiert (Nolan *et al.*, 2006). Das Programm sowie die Komponenten für die qPCR sind in Tabelle 3.10 aufgeführt.

Tabelle 3.10 Standard qPCR-Programm

| Komponente | Volumen [μ l] | PCR-Programm | Zyklen |
|--|--------------------|--|--------|
| Reinstwasser | 0,84 | 95°C, 15 min (Initialdenaturierung) | 1 x |
| 2x Master Mix | 7,5 | 95°C, 15s 50-65**°C, 30 s 72°C, 12 s | 40 x |
| ROX | 0,78 | | |
| <i>forward</i> -Primer (10 pmol/ μ l) | 0,3* | | |
| <i>reverse</i> -Primer (10 pmol/ μ l) | 0,3* | 95°C, 1 min 50-65**°C, 30 s 95°C, 30 s (Schmelzkurvenanalyse) | 1 x |
| Template DNA | 6 (cDNA) | | |

[*] =Menge der eingesetzten Primer sind abhängig vom optimalen Konzentrationsverhältnis (siehe unten),

[**] = Elongationszeit abhängig von der Länge des PCR-Produktes (Polymerase: 1000 Basen/min)

Am Ende der PCR wurde eine Schmelzkurve aufgenommen. Durch diese Analyse kann das Zielprodukt der PCR durch Messung seiner spezifischen Schmelztemperatur verifiziert werden. Darüber hinaus dient die Schmelzkurvenanalyse der Detektion unerwünschter Nebenprodukte, die in der PCR neben dem Zielprodukt gebildet werden können (Ruiz-Villalba *et al.*, 2017).

Vor Beginn der Messungen wurde die Effizienz der PCR-Reaktion für jedes verwendete Primerpaar bestimmt. Die Effizienz ist definiert als die Menge der Ziel-DNA, die in einem PCR-Zyklus gebildet wird. Im Idealfall würde sich das Ziel-Produkt nach jedem Zyklus verdoppeln, womit die Effizienz bei 100 % läge. Allerdings können verschiedene Faktoren die Primer- bzw. PCR-Effizienz beeinflussen, z.B. die Bildung von Primer-Dimeren oder unpassende Annealing-Temperaturen (Pfaffl, 2001; Svec *et al.*, 2015). Für die Bestimmung der Primereffizienz wurden Standardkurven gemessen, wobei die cDNA in Verdünnungsverhältnissen 1:2, 1:4, 1:8 sowie unverdünnt eingesetzt wurde. Bei einer Effizienz von 90 % bis 110 % wurden die Primerpaare als geeignet betrachtet. Aus den Steigungen der Regressionsgeraden wurden die Effizienzen der einzelnen Primerpaare bestimmt (Pfaffl, 2001). Als weitere Optimierung der qRT-PCR wurden die Konzentrationsverhältnisse von *forward*- und *reverse*-Primer angepasst (Tabelle 3.11). Für die einzelnen Primerpaare wurde das Konzentrationsverhältnis gewählt, bei denen der C_t -Wert am niedrigsten war.

Tabelle 3.11 Primerverhältnisse in der qPCR

| <i>Reverse-Primer</i> / <i>Forward-Primer</i> | 100 nM | 200 nM | 300 nM |
|---|---------------|---------------|---------------|
| 100 nM | 100 nM/100 nM | 100 nM/200 nM | 100/300 nM |
| 200 nM | 200 nM/100 nM | 200 nM/200 nM | 200 nM/300 nM |
| 300 nM | 300 nM/100 nM | 300 nM/200 nM | 300 nM/300 nM |

3.3.7 Klonierungsstrategien

3.3.7.1 Ligation in pGEM[®]-T Easy (*A-Tailing*)

Mit PCR-Produkten, die durch *proof-reading*-Polymerasen (Abs. 3.3.5) generiert und für die Ligation mit dem pGEM[®]-T Easy-Vektor verwendet wurden, war es notwendig, eine Adenylierung (engl. *A-Tailing*) durchzuführen. Hierbei wird am 3'-OH-Ende der PCR-Produkte eine Poly-A-Sequenz angefügt. Das *A-Tailing* ist hier erforderlich, da die *proof-reading*-Polymerasen im Gegensatz zur *Taq*-Polymerase keinen Poly-A-Überhang hinterlassen (Tabelle 3.12). Dieser wird jedoch für die Ligation mit dem pGEM[®]-T Easy-Vektor benötigt, da dieser einen T-Überhang (Thymin-Überhang) besitzt und somit eine sog. *sticky-end*-Ligation durchgeführt werden kann.

Tabelle 3.12 *A-Tailing*

| Komponente | Volumen [μ l] | Programm |
|---------------------------------------|--------------------|--------------|
| PCR-Produkt (aufgereinigt) | 14,5 | 35 min, 70°C |
| 10x Puffer mit MgCl ₂ | 2 | |
| dATPs (2 mM) | 2 | |
| <i>Taq</i> -Polymerase (5 U/ μ l) | 1,5 | |

Für die Ligation wurde ein Verhältnis von Insert zu Vektor von 3:1 eingesetzt. Der Standard-Ligationsansatz wird in Tabelle 3.13 gezeigt.

Tabelle 3.13 Standard-Ligationsansatz

| Komponente | Volumen [μ l] | Programm |
|--|--------------------|----------|
| pGem [®] -T-Easy (50 ng/ μ l) | 0,5 | RT, 1 h |
| 10x Puffer | 2 | |
| Insert | [*] | |
| Ligase (5 U/ μ l) | 0,2 | |
| Reinstwasser | ad. 20 μ l | |

[*]: Menge des Inserts richtet sich nach dessen Größe in [Bp]

3.3.8 Mini-Plasmid-Präparation („*Triton Boiling*“)

Um den Erfolg der Klonierung zu überprüfen, wurde eine Mini-Plasmid Präparation durchgeführt. Hierbei wird das Plasmid bzw. der Vektor aus den *E. coli*-Zellen der Übernachtskultur (Abs. 3.4.5) isoliert. Anschließend wird über eine Restriktionsreaktion überprüft, ob die Ligation und somit die Aufnahme des Inserts in das entsprechende Plasmid erfolgreich waren.

Zunächst wurden 3 ml der Übernachtskultur in einem RG pelletiert (13000 rpm, RT, 1 min) und der Überstand verworfen. Das Bakterienpellet wurde anschließend in 150 μ l STEL-Puffer resuspendiert, die Suspension für 30 s bei 100°C erhitzt und anschließend zentrifugiert (13000 rpm, RT, 20 min). Das Pellet wurde mit einem Zahnstocher aus dem RG entfernt. Zu der verbliebenen Lösung wurden 180 μ l 2-Propanol gegeben, invertiert und die DNA gefällt (RT, 10 min). Die Lösung wurde zentrifugiert (13000 rpm, RT, 5 min) und der Überstand anschließend entfernt. Das verbliebene DNA-Pellet wurde mit 500 μ l 70%igem Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (13000 rpm, RT, 5 min). Nach Abnahme des Überstandes wurde das Pellet für 5 min bei 45°C getrocknet und anschließend in 50 μ l RNase-Wasser inkubiert bzw. gelöst (500 rpm, 15 min, 45°C).

Tabelle 3.14 Puffer und Lösungen für die Mini-Plasmid-Präparation

| Puffer/Lösung | Komponenten |
|---------------|------------------------|
| STEL-Puffer | 8 % Saccharose (w/v) |
| | 5 % Triton-X-100 (v/v) |
| | 50 mM TRIS/HCl pH 8,0 |
| | 50 mM EDTA |
| | 0,5 mg/ml Lysozym |
| RNase-Wasser | 10 mg/ml RNase A |

Nach der Mini-Plasmid Präparation wurde ein Restriktionsverdau durchgeführt, um die Größe des Inserts zu überprüfen, welches in der Ligation in das Plasmid eingebaut wurde. Bei Verwendung des Vektors pGEM[®]-T-Easy wurde der Verdau mit dem Enzym *NotI* durchgeführt, für welches sowohl vor als auch hinter der *multiple-cloning-site* (MCS) am Plasmid Erkennungsstellen vorhanden sind.

Tabelle 3.15 Standard Restriktionsverdau

| Komponente | Volumen [µl] | Programm |
|-----------------------|--------------|-------------------------------|
| 10x Puffer | 2 | 37°C, 60 min (Restriktion) |
| Reinstwasser | 11,5 | |
| <i>NotI</i> (10 U/µl) | 5,5 | 65°C (Enzyminaktivierung) |
| Template (Plasmid) | 6 | |

Nach dem Restriktionsverdau wurde eine Agarose-Gelelektrophorese (Abs. 3.3.1) durchgeführt. Stimmt die Größe des Inserts auf dem Agarose-Gel mit der Größe des Ziel-DNA-Fragmentes überein, wurden entsprechende Klone nochmals gepickt und in 3,5 ml Übernachtskultur vermehrt. Am darauffolgenden Tag wurde das Plasmid mit dem GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Fa. Thermo Fisher) aufgereinigt. Für die Isolation größerer Mengen Plasmids (> 500 ng) wurden 50 ml Übernachtskultur angeimpft und das Plasmid mit dem PureLink[™] HiPure Plasmid Midiprep Kit (Fa. Invitrogen) aufgereinigt. Die Durchführung erfolgte bei beiden Kits nach Herstellerangaben.

3.4 Mikrobiologische Methoden

3.4.1 Steriles Arbeiten

Die Versuche mit kompetenten *E. coli*-Zellen sowie Protoplasten aus *A. thaliana* erforderten, dass unter sterilen Bedingungen gearbeitet wurde, um Kontaminationen durch Fremdkeime zu vermeiden. Die betreffenden Arbeiten wurden unter der Sterilwerkbank durchgeführt. Die Arbeitsfläche sowie sämtliche Arbeitsutensilien unter der Werkbank wurden vor Durchführung der Versuche mit 70%igem Ethanol gereinigt. Reagenzgläser wurden autoklaviert, andere Glasgeräte wurden unter dem Bunsenbrenner sterilisiert. Alle Arbeiten wurden mit Handschuhen durchgeführt, die zuvor mit Sterillium[®] gereinigt wurden. Die Lösungen für die Arbeiten mit *E. coli* wurden autoklaviert.

3.4.2 Herstellung kompetenter *E. coli*

Die Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen erfolgte nach einem Protokoll von Hanahan (1983). Hierfür wurden *E. coli*-Zellen des Stammes DH5 α (Abs. 3.1.2) aus einer Kryokultur verwendet. Zunächst wurde eine Vorkultur aus 3 ml LB-Medium mit den Zellen angeimpft und ü.N. so lange inkubiert (200 rpm, 37°C), bis die Zellen eine OD₅₈₀ von 0,5 erreicht hatten. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation (2200 g, 4°C, 5 min) pelletiert. Das Pellet wurde danach in 25 ml kaltem Transformationspuffer I resuspendiert, 30 min auf Eis inkubiert und anschließend erneut zentrifugiert (2200 g, 4°C, 5 min). Das erhaltene Pellet wurde in 5 ml kaltem Transformationspuffer II resuspendiert und in 1,5 ml RG in 200 μ l Aliquots verteilt. Die Gefäße wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

Tabelle 3.16 Puffer für die Herstellung kompetenter *E.coli*-Zellen

| Puffer/Lösung | Komponenten |
|--------------------------|---|
| Transformationspuffer I | 100 mM CaCl ₂ 50 mM RbCl 40 mM MnCl ₂ |
| Transformationspuffer II | Transformationspuffer I 20 % (w/v) Glycerin |

3.4.3 Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen

Bei der Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen werden die Vektoren aus der Ligation (Abs. 3.3.7.1) in die Bakterienzellen eingebracht und können somit vermehrt werden.

Zunächst wurden die kompetenten Zellen (Abs. 3.4.2) für 5 bis 10 min auf Eis aufgetaut. Danach wurden 10 μ l Ligationsansatz zu den Zellen gegeben, die Zellsuspension durch leichtes Schnippen gegen das RG vermischt und der Ansatz im Anschluss 25 min auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation wurde ein Hitzeschock durchgeführt (42°C, 45 s) und die Zellen im Anschluss sofort wieder für 2 min auf Eis inkubiert. Bei Raumtemperatur wurden 900 μ l SOC-Medium zu der Zellsuspension gegeben. Die Zellen wurden anschließend im Schüttler inkubiert (250 rpm, 37°C, 1,5 h).

Nach der Inkubationszeit erfolgte das Ausplattieren der Zellen auf LB-Amp-X-Gal-Platten. Es wurden pro Transformationsansatz zwei Platten vorbereitet. Dabei wurden auf einer Platte 150 μ l der transformierten Zellen ausplattiert. Auf der zweiten Platte wurde eine konzentrierte

Lösung der Zellen ausplattiert, welche durch Zentrifugation der Zellsuspension (1000 rpm, RT, 10 min) erhalten wurde. Die Platten wurden ü.N. für 16 bis 24 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Bei der Verwendung des Vektors pGem[®]-T-Easy für die Transformation war die Blau-Weiß-Selektion möglich (Koenen *et al.*, 1982), wobei die weißen Kolonien jene waren, welche ein Plasmid mit DNA-Insert aufgenommen hatten. Die Plasmide pNEV-N, pSS87 und pCS120 enthalten kein IacZ-Gen sondern nur eine Ampicillin-Resistenz als Selektionsmarker. Auf den entsprechenden Platten zeigten sich daher nur weiße Kolonien.

Tabelle 3.17 Puffer und Medien für die Transformation von *E. coli*

| Puffer/Medium | Komponenten |
|----------------------|--|
| SOB-Medium pH 7,0 | 2 % (w/v) Trypton 0,5 % (w/v) Hefeextrakt 0,05 % NaCl (w/v) NaCl 0,019 % (w/v) KCl |
| SOC-Medium | SOB-Medium 5 µl/ml 2M MgCl ₂ 20 µl/ml 1M Glucose |
| LB-Medium pH 7,5 | 1 % (w/v) NaCl 0,5 % (w/v) Hefeextrakt 1 % (w/v) Trypton Ad 1l Reinstwasser Für Platten: Zugabe von 1,5 % (w/v) Agar |
| LB-Amp-X-Gal-Platten | LB-Medium mit 1,5 % (w/v) Agar 2 µl/ml Medium Ampicillin (100 mg/ml) 1,6 µl/ml Medium X-Gal (40 mg/ml in DMF) |

3.4.4 Transformation von *S. cerevisiae*

Die Transformation von *Saccharomyces cerevisiae* des Stammes SEY2102 (Emr *et al.*, 1983) erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Soni *et al.* (1993).

Für die Transformation wurden zunächst 20 ml YPD-Medium aus einer Dauerkultur von SEY2102 angeimpft und ü.N. inkubiert (200 rpm, 30°C). Von dieser Suspension wurde anschließend die Zelldichte bestimmt und mit 20 ml YPD-Medium eine OD₆₀₀ von 0,5

eingestellt. Die Zellen wurden für weitere 3 bis 5 h auf eine OD_{600} von 2,0 wachsen gelassen. Anschließend wurden 1,4 ml dieser Zellkultur in ein 2 ml RG überführt und die Zellen sedimentiert (13000 g, RT, 20 s). Nach Abnahme des Überstandes wurden 5 μ l Carrier-DNA (20 mg/ml) und 4 μ l des Plasmidvektors zu den Zellen gegeben und gemischt. Im Anschluss wurde die Zellsuspension mit 500 μ l LP-Mix versetzt und gut mit diesem vermischt. Danach wurden 55 μ l DMSO zugegeben und inkubiert (RT, 15 min). Nach dieser Inkubation wurde ein Hitzeschock bei 42°C für 15 min durchgeführt. Nach Zugabe von 500 μ l sterilem PEG wurden die Zellen sedimentiert (1500 g, RT, 2 min), der Überstand entfernt und das Pellet in 1 ml Reinstwasser resuspendiert. Die Zellen wurden nochmals zentrifugiert (1500 g, RT, 2 min), der Überstand abgenommen und in 80 μ l Reinstwasser aufgenommen. Die Lösung wurde auf CAA-Agar-Platten ausplattiert und ü.N. bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Als Selektionsmarker diente hier das im Plasmid pNEV-N vorhandene Uracil-Gen. Der verwendete Hefestamm SEY2102 ist Uracil-defizitär und kann auf dem CAA-Mangelmedium nicht wachsen. Sobald die Hefezellen jedoch Plasmid aufgenommen hatten und somit das Uracil-Gen exprimiert wurde, war ein Wachstum auf den Platten möglich.

Tabelle 3.18 Medien und Lösungen für die Transformation von *S. cerevisiae*

| Medium/Lösung | Komponenten |
|----------------------|---|
| YPD-Medium | 2 % Trypton 1 % Hefeextrakt 2 % Glucose |
| LP-Mix | 40 % Polyethylenglykol 4000 0,1 M Lithiumacetat 10 mM TRIS/HCl pH 7,5 1 mM EDTA |
| Carrier-DNA | 2 mg/ml Heringssperma-DNA |
| CAA-Platten | 0,672 % Yeast Nitrogen Base without Amino Acids 1 % Casaminsäuren 2 % Glucose 2 % Agar |

3.4.5 Herstellung von Übernachtskulturen

Nach erfolgreicher Transformation wurden für die weitere Untersuchung und Isolation (Abs. 3.3.8) der Plasmide weiße Kolonien mit einem sterilen Zahnstocher von den Platten

aufgenommen und auf einer weiteren LB-Amp-Platte ausgestrichen. Mit dem Zahnstocher wurden anschließend 3,5 ml flüssiges LB-Amp-Medium (2 µl/ml Ampicillin) angeimpft und ü.N. inkubiert (100 rpm, 37°C, 16 h).

3.4.6 Herstellung von Dauerkulturen

Für die Herstellung von Plasmid- oder Hefe-Dauerkulturen wurden 600 µl einer Übernachtskultur (Abs. 3.4.5) zu 600 µl Glycerin gegeben, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

3.5 Funktionsüberprüfung von Saccharose-Transportern in *S. cerevisiae*

3.5.1 Shuttle-Vektor

Der Vektor pNEV-N (Sauer und Stolz, 1994) wurde für die Saccharose-Aufnahmetests in Hefezellen (*S. cerevisiae*) zur Funktionsüberprüfung von SUT1, SUT2 und SUT4 aus *Fagus sylvatica* sowie von SUT2 und SUT4 aus *Quercus robur* eingesetzt. Für den Transporter FsSUT1 lag der vollständige Vektor mit SUT-cDNA bereits aus den Arbeiten für die Dissertation von Dobbstein (2019) vor.

Vor der Ligation wurde sowohl mit den verwendeten Inserts als auch mit dem Vektor pNEV-N eine Restriktion mit dem Enzym *NotI* durchgeführt. Für die Ligation mit dem Vektor wurden die 5'-untranslatierte Sequenz aus *Arabidopsis thaliana* (5'-AAGCTTGTAAGAA) (Stadler *et al.*, 1995a; Stadler *et al.*, 1995b) sowie Erkennungssequenzen des Restriktionsenzym *NotI* in die vollständigen cDNA-Sequenzen von SUT2 und SUT4 aus *F. sylvatica* und *Q. robur* mithilfe von Primern eingebracht. Die auf diese Weise erhaltenen PCR-Produkte wurden anschließend in den Vektor pNEV-N kloniert. Die Orientierung der Inserts im Vektor wurde durch Sequenzierungen (Abs. 3.1.7) überprüft. Die Transformation der *S. cerevisiae*-Zellen (Abs. 3.4.4) wurde für jeden untersuchten SUT mit sowohl mit einem Insert in *sense*- als auch mit einem Insert in *antisense*-Orientierung im Vektor durchgeführt. Das *antisense*-Konstrukt diente in den Aufnahmetests mit ¹⁴C-Saccharose als Negativkontrolle.

Tabelle 3.19 Restriktion pNEV-N und Insert

| Komponente | Volumen [µl] | Programm |
|-----------------------|--------------|--------------------------------------|
| 10x Puffer | 2 | 37°C, 60-90 min (Restriktion) |
| <i>NotI</i> (10 U/µl) | 1 | |
| Insert | 1,5 µg | 65°C, 20 min (Enzyminaktivierung) |
| Reinstwasser | ad. 20 µl | |

Der geschnittene Vektor pNEV-N wurde nach der Restriktion mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert, um eine erneute Ligation der Enden des Vektors zu vermeiden.

Tabelle 3.20 Dephosphorylierung von pNEV-N

| Komponente | Volumen [μ l] | Programm |
|--------------------------------------|--------------------|--------------------------------------|
| 10x Puffer | 2 | 37°C, 12 min (Dephosphorylierung) |
| Alkalische Phosphatase (1U/ μ l) | 1 | |
| pNEV-N (geschnitten) | 10 μ g | 75°C, 5 min (Enzymaktivierung) |
| Reinstwasser | ad. 20 μ l | |

Für die Ligation wurden die in Tabelle 3.13 angegebenen Volumina verwendet. Das Verhältnis Insert zu Vektor betrug 1:3. Es wurden 30 ng Vektor eingesetzt.

3.5.2 Aufnahmetests mit ^{14}C -Saccharose

Nach der erfolgreichen Transformation der *S. cerevisiae*-Zellen (Abs. 3.4.4) wurden Aufnahmetests mit ^{14}C -markierter Saccharose durchgeführt (Gahrtz *et al.*, 1994).

Die von den CAA-Platten entnommenen transformierten Zellen wurden in einer Übernachtskultur in flüssigem CAA-Medium zu einer OD_{578} von 2 wachsen gelassen. Die Zellen wurden zentrifugiert (3500 x *g*, RT, 4 min) und nach Entfernung des Überstandes in 25 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ - Puffer resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation (3500 x *g*, RT, 4 min) wurde mit dem o.g. Puffer eine Zelldichte von 20 OD/ml eingestellt. Die Zellsuspension wurde bei 30°C geschüttelt und die Saccharose-Aufnahme wurde durch die Zugabe von ^{14}C -markierter Saccharose initiiert. Nach 30 s sowie nach 2, 4, 6, 8 und 10 min wurden Proben entnommen und durch eine Nitrozellulose-Membran (0,8 μ m Porengröße) filtriert. Die Radioaktivität wurden mit einem Szintillationszähler gemessen. Um die K_m -Werte zu ermitteln wurden Saccharose-Konzentrationen von 10, 20, 40, 60, 80, 100, 150, 200 und 300 mM verwendet.

3.6 Einbettung von pflanzlichem Gewebe

Die Fixierung und Einbettung des pflanzlichen Gewebes erfolgte nach modifizierten Protokollen von Jackson (1992) und Karlgren *et al.* (2009). Die Einbettung wurde unter RNase-freien Bedingungen durchgeführt. Alle verwendeten Lösungen und Puffer wurden in DEPC-behandeltem Wasser angesetzt. Die verwendete Glasware wurde für 8 h bei 200°C ausgebacken. Zudem wurde mit Nuklease-freier Kunststoffware gearbeitet. Arbeitsplatz und Handschuhe wurden mit RNase-Away® gereinigt.

3.6.1 Fixierung

Die Fixierung des pflanzlichen Gewebes sowie die anschließende Einbettung in Paraffin-Wachs diente als Vorbereitung für die *in-situ*-Hybridisierung zur Lokalisation der mRNA von Saccharose-Transportern. Durch die Fixierung des pflanzlichen Gewebes wurde der Zustand der Zellen zum Sammelzeitpunkt der Proben festgehalten. Die Fixierung gewährleistet, dass die zu untersuchende mRNA in den Zellen nicht degradiert sondern erhalten bleibt (Karlgrén *et al.*, 2009).

Für die Fixierung wurden zwei Lösungen verwendet. Fixierlösung 1 wurde für die Proben aus *F. sylvatica* und *Q. robur* verwendet. Fixierlösung 2 wurde für die Proben von *P. abies* verwendet.

Tabelle 3.21 Fixierlösungen

| Lösung | Komponenten |
|------------------------|--|
| Fixierlösung 1, pH 7,2 | 4 % (w/v) Paraformaldehyd 0,1 % (v/v) Tween-20 0,1 % (v/v) Triton X-100 0,5 mM NaOH in 1x PBS |
| Fixierlösung 2, pH 7,2 | 4 % (w/v) Paraformaldehyd 0,25 % (v/v) Glutaraldehyd 70 mM EGTA 10 % DMSO 0,05 % Tween-20 0,05 % Triton X-100 0,5 mM NaOH in 1x PBS |

Die Fixierlösungen wurden am Sammeltag der Proben frisch angesetzt und bis zum Gebrauch auf Eis gelagert. Die Proben wurden nach dem Sammeln sofort in Petrischalen überführt, welche mit Fixierlösung gefüllt waren. In den Petrischalen wurden die Proben mit einem sterilen Skalpell zugeschnitten und anschließend in 6-Well-Platten überführt, welche ebenfalls mit frischer Fixierlösung befüllt waren. Ob die Proben nach dem Sammeln in der Fixierlösung zugeschnitten wurden, hing von der Gewebeart ab. Blätter wurden in rechteckige Fragmente so zerschnitten, dass die kleinsten Blattadern für die späteren Dünnschnitte am Mikrotom erhalten

blieben. Nadeln wurden als Ganzes fixiert. Zweige wurden in ca. 0,5 cm große Fragmente zerschnitten. Die weiblichen Blüten aus *F. sylvatica* bestehen aus zwei Teilblüten (Rodríguez-Ramírez *et al.*, 2021) und wurden zwischen diesen zerschnitten. Die Teilblüten wurden als Ganzes fixiert und eingebettet.

Um das Eindringen der Fixierlösung in das Zellinnere zu erleichtern, wurden die Proben unter Vakuum für 30 min auf Eis inkubiert. Die Proben wurden danach in 6-Well-Schalen mit frischer Fixierlösung überführt und über Nacht bei 4°C und 30 rpm inkubiert.

3.6.2 Entwässerung und Einbettung

Am Folgetag nach der Fixierung wurden die Proben in einer in ihrer Konzentration aufsteigenden Ethanol-Reihe entwässert. Dafür wurde das Gewebe mit einer Pinzette in Einbettkassetten überführt. Die Schritte bis zum 60 %igen Ethanol wurden per Hand auf Eis wie folgt durchgeführt.

| | |
|-----------|---------------------|
| 1x PBS | 2 x 30 min, auf Eis |
| 30 % EtOH | 1 h, auf Eis |
| 50 % EtOH | 1 h, auf Eis |
| 60 % EtOH | 1 h, auf Eis |

Die folgenden Schritte der Entwässerung (70 – 100 % EtOH), die Eosin-Färbung der Proben sowie ihre Überführung in Paraffin-Wachs wurden in einem Gewebeinfiltrationsautomaten (Fa. Leica) unter Vakuum durchgeführt.

| | |
|--------------------------------|-----|
| 70 % EtOH | 3 h |
| 95 % EtOH + 0,1 % (v/v) Eosin | 3 h |
| 100 % EtOH + 0,1 % (v/v) Eosin | 3 h |
| 100 % EtOH | 3 h |
| 100 % EtOH | 3 h |
| 50 % EtOH + 50 % HistoChoice® | 3 h |
| 25 % EtOH + 75 % HistoChoice® | 3 h |
| 100 % HistoChoice® | 3 h |
| 100 % HistoChoice® | 3 h |
| 100 % HistoChoice® | 3 h |
| ParaplastPlus® | 4 h |
| Paraplast® | 6 h |

Nach der Entwässerung wurden die Einbettkassetten im Hybridisierungssofen (60°C) in Schalen mit flüssigem Paraplast® überführt. Die Proben wurden mit Paraplast® in Einbettformen eingebettet und nach der Aushärtung bei 4°C gelagert.

3.7 RNA-*in-situ*-Hybridisierung

Für die RNA-*in-situ*-Hybridisierung wurde ausschließlich mit DEPC-behandeltem Wasser gearbeitet. Es wurde sterile sowie RNase/Nuklease-freie Kunststoffware verwendet, der Arbeitsplatz sowie die Handschuhe wurden mit RNase-Away® gereinigt. Sämtliche verwendete Glasware wurde für mindestens 8 h bei 200°C ausgebacken.

3.7.1 Sondensynthese

Die *in-situ*-Hybridisierung wurde mit Digoxigenin-Uracil-markierten Sonden durchgeführt. Für die Synthese der Sonden wurde ein modifiziertes Protokoll von Karlgren *et al.* (2009) verwendet.

Die PCR-Primer wurden so generiert, dass die Sondensequenzen zwischen 300 und 700 Basen lang waren. Zudem wurde der Bereich des zytoplasmatischen Loops durch die Sonden abgedeckt. Der Grund hierfür ist, dass sich die SUTs im Bereich des Loops in den Basenabfolgen am meisten voneinander unterscheiden und somit die *GOI* präzise lokalisiert werden können.

Die PCR-Produkte für die Sonden wurden in die *multiple cloning site* des Vektors pGEM®-T-Easy kloniert (Abs. 3.3.7.1). Dieser besitzt *upstream* und *downstream* der *MCS* Erkennungssequenzen für die SP6- und T7-RNA-Polymerase, welche als Promotoren für die Synthese der RNA-Sonden dienen. Für die *in-situ*-Hybridisierung wurden für jeden SUT *sense*- und *antisense*-Sonden synthetisiert, wobei die *sense*-Sonden als Negativkontrolle verwendet wurden. Welche RNA-Polymerase für die Synthese der *sense*- bzw. *antisense*-Sonden Verwendung fand, hing von der Orientierung des Inserts im Vektor ab. Diese wurde durch Sequenzierungen (Abs. 3.1.7) ermittelt.

Der erste Schritt der Sondensynthese war die Linearisierung des Plasmids. Die Anforderungen an die dafür verwendeten Restriktionsenzyme waren, dass sie keinen 3'-Überhang hinterlassen und keine Erkennungssequenzen im Insert besitzen dürfen. Zudem durften die Enzyme nur eine Schnittstelle gegenüber dem Promotor für die SP6-bzw. T7-Polymerase besitzen. Enzyme, die diese Voraussetzungen erfüllten waren *SpeI* (20 U/μl) und *NdeI* (20 U/μl), welche jeweils gegenüber dem T7-Promotor liegen sowie *NcoI* (10 U/μl) gegenüber dem SP6-Promotor.

Für die Linearisierung des Plasmids wurde der folgende Ansatz verwendet:

Tabelle 3.22 Sonden-Synthese: Plasmid-Linearisierung

| Komponente | Volumen/Menge | Programm |
|--------------|---------------|------------------|
| Plasmid | 10-15 µg | 16 h, 37°C, ü.N. |
| Puffer | 10 µl | |
| Enzym | 2 µl | |
| Reinstwasser | ad 20 µl | |

Für die Überprüfung der Vollständigkeit der Plasmid-Linearisierung wurden 5 µl des Ansatzes auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen (Abs. 3.3.1). Das linearisierte Plasmid wurde anschließend mit dem GeneJET PCR Purification Kit (siehe Abs. 3.1.4) aufgereinigt. Die Säule wurde vorher mit 500 µl DEPC-Wasser gespült.

Für die Synthese der RNA-Sonde wurde anschließend das linearisierte Plasmid als Template genutzt. Pro Sonde wurden zwei Ansätze für die Transkription angesetzt, da die *in-situ*-Hybridisierung sowohl mit einer hydrolysierten als auch mit der unhydrolysierten Sonde durchgeführt wurde.

Tabelle 3.23 Sondensynthese

| Komponente | Volumen/Menge | Programm |
|-----------------------------|---------------|-----------|
| Linearisiertes Plasmid | 1 µg | 2 h, 37°C |
| 10x DIG-dNTP-Mix | 2 µl | |
| 5x Puffer | 4 µl | |
| T7/SP6-Polymerase (20 U/µl) | 2 µl | |
| RNAse-Inhibitor (40 U/µl) | 1 µl | |
| DEPC-Wasser | Ad 20 µl | |

Nach der Sondensynthese wurde der Ansatz in ein 0,5 ml RG überführt und ein DNase-Verdau durchgeführt, um DNA aus dem Ansatz zu entfernen.

Tabelle 3.24 Sondensynthese: DNase-Verdau

| Komponente | Volumen | Programm |
|-----------------|---------|--------------|
| Sonde | 20 µl | 45 min, 37°C |
| tRNA (50 mg/ml) | 2 µl | |
| DNase (1 U/µl) | 5 µl | |
| DEPC-Wasser | 73 µl | |

Nach dem DNase-Verdau wurde der Ansatz in ein 1,5 ml RG überführt und die Reaktion mit 20 µl EDTA (200 mM) gestoppt. Anschließend wurde die Präzipitation der Sonde durchgeführt. Dazu wurden dem Ansatz 5 µl 5M LiCl sowie 275 µl 100%iges Ethanol hinzugefügt, vermischt und die Sonde bei -20°C für 2 h gefällt. Nach der Fällung wurde die Lösung zentrifugiert (13000 rpm, 4°C, 30 min), der Überstand abgenommen, das Pellet mit 100 µl 70%igem Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (13000 rpm, 4°C, 5 min). Das Ethanol wurde vollständig entfernt und das Pellet im offenen RG unter dem Abzug getrocknet. Anschließend wurde das Pellet in 50 µl Nuklease-freiem Wasser resuspendiert. Die Sonde, mit der keine Hydrolysierung erfolgte, wurde bei -80°C eingefroren.

Für die Hydrolyse wurde die in Wasser gelöste Sonde mit 50 µl Carbonatpuffer (200 mM NaHCO₃/200 mM Na₂CO₃, pH 10,2) versetzt. Die Lösung wurde anschließend bei 60°C inkubiert. Die Inkubationszeit richtete sich hierbei nach der folgenden Formel:

$$t_{\text{Hydrolyse}} [\text{min}] = (L_i - L_f) / (K * L_i * L_f)$$

Wobei: L_i = Länge der Sonde[kB] (nicht hydrolysiert); L_f [kB]= finale Länge der Sonde (hydrolysiert); $K = 0,11$ kB/min

Für die hydrolysierte Sonde wurde eine Länge von 150 bis 200 Basen angestrebt.

Nach der Inkubation im Carbonatpuffer wurde die Hydrolyse mit 10 µl 10%iger Essigsäure und 12 µl 3 M Natriumacetat gestoppt. Anschließend wurde eine Präzipitation der hydrolysierten Sonde durchgeführt. Die Lösung wurde dafür mit 312 µl kaltem 100%igem Ethanol versetzt und die Sonde bei -20°C eine 1 h gefällt. Die Lösung wurde anschließend zentrifugiert (13000 rpm, 4°C, 10 min), das Pellet mit 500 µl 70%igem Ethanol gewaschen und ein zweites Mal zentrifugiert (13000 rpm, 4°C, 5 min). Das Ethanol wurde vollständig abgenommen und das Pellet unter dem Abzug im offenen RG getrocknet. Die hydrolysierte Sonde wurde in 50 µl RNase-freiem Wasser gelöst und ebenfalls bei -80°C gelagert.

Der Erfolg der Sondensynthese wurde auf einem 1%igen Agarose-Gel mit jeweils 1 µl der hydrolysierten bzw. nicht hydrolysierten Sonde überprüft.

3.7.2 Dünnschnitte am Mikrotom

Für die *in-situ*-Hybridisierung wurden Dünnschnitte am Mikrotom angefertigt. Zuvor wurden die Wachsböcke (Abs. 3.6.2) in Form geschnitten und auf Einbettkassetten aufgebracht, die anschließend in das Mikrotom eingespannt werden konnten. Bis zur Anfertigung der Dünnschnitte wurden die Proben bei 4°C gelagert.

Für die Dünnschnitte am Mikrotom wurde eine Schnittdicke von 8 µm (Blätter und Nadeln) bis 10 µm (Rinde, Holz und Blüten) gewählt. Als Objektträger wurden vorbehandelte Superfrost®- bzw. Superfrost®-Plus-Objektträger mit Goldanteil verwendet, die eine gute Haftung der Proben gewährleisten. Die Superfrost®-Plus-Objektträger wurden für die Rinden- und Holzproben verwendet.

3.7.3 Vorbehandlung der Gewebeschnitte für die Hybridisierung

Die *in-situ*-Hybridisierung sowie die Vorbereitung des Gewebes für die Hybridisierung wurden nach modifizierten Protokollen von Jackson (1992), Freeling und Walbot (1994), Javelle *et al.* (2011) durchgeführt.

Die für die *in-situ*-Hybridisierung verwendeten Stock-Lösungen sind im Anhang aufgeführt.

Für die Vorbehandlung des Gewebes wurden die folgenden Lösungen angesetzt:

Tabelle 3.25 Lösungen für die Gewebe-Vorbehandlung

| Lösung | Konzentration |
|-----------------------------------|--|
| Pronase | 0,125 mg/ml in 1x Pronase-Puffer (50 mM TRIS-HCl, pH 7,5; 5mM EDTA) |
| Glycin | 0,2 % (v/v) in 1xPBS |
| Paraformaldehyd pH7,0 | 4 % PFA 0,5 mM NaOH in 1x PBS |
| Essigsäureanhydrid/Triethanolamin | 0,1 M Triethanolamin 50mM Essigsäureanhydrid 0,1M HCl |

| | |
|--------|--|
| 1x PBS | 0,15 M NaCl 7 mM Na ₂ HPO ₄ 3 mM NaH ₂ PO ₄ pH7, in DEPC-Wasser, autoklaviert |
|--------|--|

Die Objektträger mit den Gewebeschnitten wurden in Glashalterungen platziert. Die folgenden Schritte zum Entwachsen und zur Rehydrierung der Gewebeschnitte wurden in Glasschalen durchgeführt:

| | |
|-------------------------------|--------|
| 100 % HistoClear [®] | 10 min |
| 100 % HistoClear [®] | 10 min |
| 100 % EtOH | 1 min |
| 100 % EtOH | 30 s |
| 95 % EtOH | 30 s |
| 85 % EtOH, 0,85 % NaCl | 30 s |
| 70 % EtOH, 0,85 % NaCl | 30 s |
| 50 % EtOH, 0,85 % NaCl | 30 s |
| 30 % EtOH, 0,85 % NaCl | 30 s |
| 0,85 % NaCl | 2 min |

Nach dem Entwachsen wurde ein Pronase E-Verdau mit den Gewebeschnitten durchgeführt. Bei Pronase handelt es sich um ein enzymatisches Gemisch von Proteasen aus *Streptomyces griseus*, welches eine hohe Anzahl an Peptidbindungen spalten kann (Vosbeck *et al.*, 1975; Bermejo-Barrera *et al.*, 1999). Der Verdau mit Pronase E ist erforderlich, da dieser die Durchlässigkeit des Pflanzengewebes für die Sonde hin zur zellulären RNA erhöht. Darüber hinaus werden in den Präparaten noch vorhandene Nukleasen abgebaut (Javelle *et al.*, 2011; Mulisch *et al.*, 2015). Die Behandlung der Präparate mit Pronase E wurde je nach Gewebeart unterschiedlich lange durchgeführt. Blätter und Früchte wurden für 15 min in Pronase E inkubiert, Nadel-, Rinde- sowie Holzsnitte für 25 min. Die Aktivität der Pronase E wurde nach dem Verdau mit 0,2%igem Glycin gestoppt.

| | |
|------------------------|-----------------|
| 1x PBS | 2 min |
| 0,125 mg/ml Pronase E | 15-25 min, 37°C |
| 0,2 % Glycin in 1x PBS | 2 min |
| 1x PBS | 2 min |

Anschließend wurden die Gewebeschnitte in 4%igem Paraformaldehyd inkubiert, um die RNA, welche durch die Behandlung mit Pronase E hätte beschädigt werden können, wieder zu fixieren.

| | |
|---------------------|--------|
| 4 % Paraformaldehyd | 10 min |
| 1x PBS | 2 min |
| 1x PBS | 2 min |

Vor der Entwässerung wurden die Gewebeschnitte in Triethanolamin/Essigsäureanhydrid inkubiert. Durch Essigsäureanhydrid werden positive Ladungen an freien Aminosäuren in den Gewebeschnitten neutralisiert, wodurch gewährleistet wird, dass die negativ geladene Sonde spezifisch an mRNA im Gewebe bindet und unspezifische Bindungen der Sonde vermieden werden (Zeller *et al.*, 2001; Hohagen *et al.*, 2015).

| | |
|---|--------|
| 50mM Essigsäureanhydrid in 0,1 M Triethanolamin | 10 min |
| 1x PBS | 2 min |
| 0,85 % NaCl | 2 min |

Anschließend wurden die Gewebeschnitte mit einer Ethanol-Reihe dehydratisiert.

| | |
|------------------------|------|
| 30 % EtOH, 0,85 % NaCl | 30 s |
| 50 % EtOH, 0,85 % NaCl | 30 s |
| 70 % EtOH, 0,85 % NaCl | 30 s |
| 85 % EtOH, 0,85 % NaCl | 30 s |
| 95 % EtOH | 30 s |
| 100 % EtOH | 30 s |

Die Objektträger wurden schließlich unter dem Abzug getrocknet.

3.7.4 Hybridisierung und Antikörperfärbung

Für die Vorbereitung der *in-situ*-Hybridisierung wurden die Sonden auf Eis aufgetaut und anschließend in den Hybridisierungspuffer pipettiert. Für jeden Objektträger wurden 2 µl Sonde in 120 µl Hybridisierungspuffer gegeben. Die Zusammensetzung des Hybridisierungspuffers ist in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Tabelle 3.26 Hybridisierungspuffer

| Komponente | Volumen [μl] | Konzentration |
|------------------------|------------------------------------|---|
| 10x Salze | 100 | 3M NaCl; 0,1M TRIS-HCl pH 6,8; 0,1M NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ -Puffer 50 mM EDTA |
| deionisiertes Formamid | 400 | 100 % |
| tRNA | 10 | 100 mg/ml |
| 50x Denhardt's | 20 | |
| Dextransulfat | 200 | 50 % (w/v) |
| DEPC-Wasser | 70 | |

Die Sonde im Hybridisierungspuffer wurde in einem 1,5 ml RG für 5 min bei 80°C erhitzt und anschließend auf Eis gekühlt. Auf die Objektträger wurden jeweils 120 μ l des Sonden-Puffer-Gemischs aufgetragen und danach mit Parafilm überdeckt. Die Objektträger wurden in Objektträgerkästen, welche mit in 50%igem deionisierten Formamid befeuchteten Tüchern ausgelegt waren, über Nacht bei 45-55°C für mindestens 16 h im Hybridisierungssofen inkubiert. Die Hybridisierungstemperatur wurde je nach Gewebe unterschiedlich hoch gewählt. Blattproben wurden bei 48°C, Nadelproben bei 50°C und Holz-, Rinde- sowie Blütenproben bei 55°C inkubiert.

Am Folgetag wurden zunächst Waschschrte zur Entfernung unspezifisch gebundener Sonde durchgeführt. Durch die Behandlung der Präparate mit RNase A wird überschüssige Sonde, die nicht an zelluläre RNA hybridisiert wurde, entfernt und somit das Hintergrundsignal effizient reduziert (Mulisch *et al.*, 2015). Zunächst wurden die Objektträger in 2x SSC getaucht, um den Parafilm zu entfernen. Anschließend wurden die Gewebeschnitte in den Glashalterungen platziert. Im Anschluss daran wurden die folgenden Waschschrte durchgeführt. Die Puffer sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Tabelle 3.27 Waschlösungen

| Puffer | Komponenten |
|---------------|--|
| 2x SSC | 30 mM NaCl 3 mM Natriumcitrat in Reinstwasser |
| 1x NTE | 0,5 M NaCl 10 mM TRIS HCl, pH 7,5 1 mM EDTA in Reinstwasser |

Die Waschschritte wurden wie folgt durchgeführt:

| | |
|--------------------------------------|----------------|
| 2x SSC + 20 % deionisiertes Formamid | 30 min, 50°C |
| 2x SSC + 20 % deionisiertes Formamid | 1 h, 50°C |
| 1x NTE + 20 µg/ml RNase A | 30 min, 37°C |
| 1x NTE | 3x 5 min, 37°C |
| 2x SSC + 20 % Formamid | 1 h |
| 1 x PBS | 5 min |

In den nachfolgenden Schritten wurde die Antikörper-Färbung vorbereitet. Die Puffer für die Antikörper-Färbung sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Tabelle 3.28 Puffer für die Antikörper-Färbung

| Puffer | Komponenten |
|---------------|---|
| 1x Puffer 1 | 0,1M TRIS-HCl, pH 7,5 0,15 M NaCl in Reinstwasser |
| Puffer 2 | 0,5 % (w/v) Blocking-Reagenz (Roche) in 1x Puffer 1 |
| Puffer 3 | 1 % (w/v) BSA 0,3 % (v/v) Triton X-100 in 1x Puffer 1 |
| Puffer 4 | 0,2 % (v/v) Anti-Digoxigenin-Antikörper in Puffer 3 |

| | |
|----------|---|
| Puffer 5 | 100 mM TRIS pH 9,5 100 mM NaCl 50 mM MgCl ₂ in Reinstwasser |
| Puffer 6 | 1 % (v/v) BCIP (9,4 mg/ml in 100 % DMF) 1 % (v/v) NBT (18,7 mg/ml in 70 % DMF) 1 % (v/v) Levamisol (24 mg/ml) in 1x Puffer 5 |

Die Objektträger wurden vor der Antikörperbindung wie folgt behandelt:

| | |
|-------------|--------|
| 1x Puffer 1 | 5 min |
| Puffer 2 | 30 min |
| Puffer 3 | 30 min |

Nach der Inkubation in Puffer 3 wurden die Objektträger erneut in Objektträgerkästen, die mit in Reinswasser getränkten Tüchern ausgelegt waren, überführt. Für die Antikörperbindung wurden jeweils 400 µl Puffer 4 auf die Objektträger pipettiert und für 2,5 h im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die folgenden Waschschriffe durchgeführt:

| | |
|----------|-----------|
| Puffer 3 | 4x 20 min |
| Puffer 1 | 5 min |
| Puffer 5 | 5 min |

Die Färbung der Präparate erfolgte mit BCIP/NBT. Die Reaktion beruht auf der Umsetzung der beiden Substrate zu einem tiefblauen bis violetten Farbstoff durch die an den Antikörper gekoppelte alkalischen Phosphatase. Durch das Enzym wird BCIP zunächst zu einem blauen Zwischenprodukt hydrolysiert, welche anschließend durch das NBT oxidiert wird. Durch die Oxidation entsteht das intensiv blau bis violett gefärbte Dimer, bei welchem es sich um einen unlöslichen Farbstoff handelt (McGadey, 1970). Für die Färbung wurden die Objektträger wieder in Objektträgerkästen (feuchte Kammer) überführt. Es wurden jeweils 400 µl Färbelösung (Puffer 6) auf die Objektträger gegeben. Die Kästen wurden geschlossen und die Proben für mindestens 2 Tage und maximal 5 Tage bei RT inkubiert. Die Färbelösung wurde mindestens einmal am Tag durch neue Lösung ersetzt. Der Fortschritt der Färbung an den Gewebeschnitten wurde täglich überprüft. Sobald Färbung an Zellen zu erkennen war, wurde die Reaktion gestoppt, die Objektträger erneut in Glashalterungen überführt und wie folgt für die dauerhafte Lagerung behandelt:

| | |
|-------------|-------|
| 1x Puffer 5 | 2 min |
| 50 % EtOH | 2 min |
| 70 % EtOH | 2 min |
| 95 % EtOH | 2 min |
| 100 % EtOH | 2 min |
| Xylol | 10 s |

Anschließend wurden die Objektträger unter dem Abzug getrocknet und mit jeweils drei Tropfen Entellan® (Fa. Merck) eingedeckt.

3.8 Intrazelluläre Lokalisation

Die intrazelluläre Lokalisation von Saccharose-Transportern aus *F. sylvatica* und *Q. robur* wurde mit Protoplasten aus *Arabidopsis thaliana* durchgeführt. Zunächst wurden die Protoplasten aus den Blättern von *A. thaliana* isoliert und anschließend mit GFP-markierten Plasmiden (GFP: Grün fluoreszierendes Protein), welche die entsprechenden SUTs enthielten, transformiert.

3.8.1 Plasmide

Für die Transformation der Protoplasten wurden die Vektoren pSS87 (Schneider *et al.*, 2012) sowie pCS120 (Dotzauer *et al.*, 2010) verwendet. Beide Plasmide enthalten für die Überprüfung der intrazellulären Expression der SUTs das GFP als Reportergen. Im pSS87 wurde das GFP am N-Terminus und im PCS120 wurde das GFP am C-Terminus des zu untersuchenden Proteins gekoppelt.

Zunächst wurden die vollständigen cDNA-Sequenzen des SUT1, SUT2 und SUT4 aus *F. sylvatica* und *Q. robur* in die *NotI*-Schnittstelle des pGEM-T-Easy® kloniert. Die verwendeten PCR-Primer für diese Vollängen waren mit Schnittstellen verschiedener Restriktionsenzyme versehen. Dies war notwendig, da die Sequenzen im nachfolgenden Schritt in die *NcoI*-Schnittstelle der Plasmide pSS87 und pCS120 kloniert wurden. Jedoch konnte nicht für alle untersuchten Transporter die *NcoI*-Schnittstelle verwendet werden. Der Grund dafür ist, dass die Erkennungssequenzen des Enzyms teilweise in den Sequenzen der Saccharose-Transporter vorhanden sind. Eine Umklonierung der vollständigen Sequenz in die Ziel-Vektoren wäre somit nicht möglich gewesen. Aus diesem Grund wurden Schnittstellen anderer Restriktionsenzyme für die PCR-Primer gewählt. Diese hinterlassen nach der Restriktion denselben Überhang für die *sticky-end*-Ligation, wie auch nach der Restriktion mit *NcoI* vorhanden bleibt.

Die für die Restriktion der Inserts verwendeten Enzyme sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Tabelle 3.29 Restriktionsenzyme pSS87 & pCS120

| Baum | Saccharose-Transporter | Enzym |
|------------------------|------------------------|------------------------------|
| <i>Fagus sylvatica</i> | SUT1 | <i>BsmBI</i> (10 U/ μ l) |
| | SUT2 | <i>NcoI</i> (10 U/ μ l) |
| | SUT4 | <i>PciI</i> (10 U/ μ l) |
| <i>Quercus robur</i> | SUT1 | <i>NcoI</i> |
| | SUT2 | <i>NcoI</i> |
| | SUT4 | <i>PciI</i> |

Nach der erfolgreichen Klonierung in den pGEM-T-Easy[®]-Vektor wurden die Sequenzen durch die in Tabelle 3.29 aufgeführten Restriktionsenzyme aus dem Vektor geschnitten. Die Aufreinigung der ausgeschnittenen Sequenz erfolgte über das GeneJET Gel Extraction Kit nach Herstellerangaben (siehe Tabelle 3.2). Anschließend erfolgte die Klonierung jeweils in die *NcoI*-Schnittstelle des pSS87 und pCS120.

Beide Vektoren wurden zunächst jeweils mit *NcoI* geschnitten und anschließend dephosphoryliert. Die Volumina bzw. Konzentrationen für die Restriktionen wurden wie in Tabelle 3.19 und Tabelle 3.20 beschrieben eingesetzt. Für die Ligation wurden die in Tabelle 3.13 angegebenen Volumina verwendet. Bei den Ligationen wurde hierbei ein Verhältnis von Insert zu Vektor von 1:5 gewählt, wobei 40 ng Vektor eingesetzt wurden.

Für die Untersuchungen der intrazellulären Lokalisation mussten die SUT-Sequenzen in *sense*-Orientierung im Plasmid liegen. Die Orientierung der Inserts in den jeweiligen Plasmiden wurde sowohl durch PCR-Reaktionen als auch durch Sequenzierungen überprüft. Für die Transformation der Protoplasten (Abs. 3.8.3) wurden als Positivkontrolle die Plasmide pSS87 sowie pCS120 ohne Insert verwendet.

3.8.2 Isolation von Protoplasten

Die Isolation von Protoplasten aus *A. thaliana* erfolgte nach einem Protokoll von Ochoa-Fernandez *et al.* (2016). Sämtliche Arbeiten für die Isolation und Transformation der Protoplasten wurden unter der Sterilwerkbank durchgeführt. Die verwendeten Puffer und Medien wurden sterilfiltriert (Porengröße 0,22 μ m). Alle Zentrifugationen wurden mit

ausgeschalteter Beschleunigung bzw. Abbremsung durchgeführt, um eine Zerstörung der Protoplasten zu vermeiden.

Zunächst wurden zwei runde Petrischalen mit 4 ml bzw. 6 ml MMC-Puffer befüllt. Es wurden Blätter der *A. thaliana*-Pflanzen gesammelt und zum Schneiden in die Petrischale überführt, welche mit 4 ml MMC-Puffer befüllt war. Die Blätter wurden im Puffer mit einem sterilen Skalpell geschnitten und anschließend in die Petrischale überführt, welche 6 ml MMC-Puffer enthielt. Zu dieser Lösung wurden 2 ml einer 5%igen Enzymlösung, bestehend aus Cellulase und Macerozym, hinzugefügt. Die Petrischale wurde mit Parafilm versiegelt und in Aluminiumfolie eingewickelt über Nacht bei 21°C inkubiert.

Am Folgetag wurde das geschnittene Blattmaterial im MMC-Puffer homogenisiert, indem die Suspension mehrmals auf- und abpipettiert wurde. Die Lösung wurde anschließend über einen Filter (Porengröße 70 µm) in ein Falcon-Gefäß filtriert, mit 50 ml frischem MMC-Puffer aufgefüllt und zentrifugiert (100 x g, 15 min). Der Überstand wurde nach dem Zentrifugieren entfernt und die Zellsuspension vorsichtig mit 10 ml MSC-Puffer versetzt. Die Lösung wurde anschließend in ein Rundboden-Falcon-Gefäß überführt, mit 2 bis 3 ml 3M-Puffer überschichtet und zentrifugiert (80 x g, 10 min). Nach der Zentrifugation hatten sich die intakten Protoplasten in der Interphase im Röhrchen gesammelt. Diese wurden mit einer Pipette abgenommen und in ein neues Rundkolben-Falcon-Gefäß überführt, welches mit 7 ml W5-Lösung gefüllt war. Die MSC-Lösung wurde erneut mit 2 bis 3 ml M3-Puffer überschichtet und die Zentrifugation (80 x g, 10 min) wiederholt. Die Protoplasten aus der Interphase wurden mit jenen aus der ersten Isolation im W5-Puffer vereinigt.

Die Protoplasten wurden anschließend in einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer unter dem Mikroskop gezählt. Um die Anzahl der Protoplasten in der Lösung zu berechnen wurden 4 Quadrate in der Zählkammer ausgezählt. Die Isolation wurde als erfolgreich betrachtet, wenn die Anzahl der Protoplasten zwischen 3 bis 8 Millionen betrug. Die Protoplasten wurden anschließend durch Zentrifugation (80 x g, 10 min) pelletiert und anschließend mit 3M-Puffer auf eine Konzentration von 500.000 Protoplasten pro 100 µl eingestellt.

Tabelle 3.30 Puffer und Medien für die Protoplasten-Isolation

| Puffer/Medium | Komponenten |
|---------------|--|
| MMC | 10 mM MES 40 mM CaCl ₂ * 2 H ₂ O 0,5 M Mannitol pH 5,8, sterilfiltriert |
| MSC | 10 mM MES 20 mM MgCl ₂ * 6 H ₂ O 0,5M Mannitol 0,4 M Saccharose pH5,8, sterilfiltriert |
| 3M | 15 mM MgCl ₂ 5mM MES 0,5 M Mannitol pH 5,8, sterilfiltriert |
| W5 | 2 mM MES 154 mM NaCl 125 mM CaCl ₂ * 2 H ₂ O 5mM KCl 5 mM Glucose pH 5,8, sterilfiltriert |
| Enzymlösung | 5 % Maceroenzym 5 % Cellulase in MMC |
| PCA-Medium | 3,2 g/l B5 salts 500 mg/l MgSO ₄ * 7 H ₂ O 500 mg/l CaCl ₂ * 2 H ₂ O 976 mg/l MES 20 g/l Saccharose 80 g/l Glucose 2 mg/l Calcium-Panhotenat 100 µl Biotin-Lösung (c = 0,2 mg/ml) |

3.8.3 Transformation von Protoplasten

Die Transformation der Protoplasten erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Yoo *et al.* (2007).

In einem 2 ml RG wurden zu 200 μ l Protoplasten 15 bis 30 μ g Plasmid gegeben, wobei maximal 20 μ l Plasmid-Lösung hinzugegeben wurden. Der Ansatz wurde für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 120 μ l PEG₄₀₀₀-Lösung vorsichtig dazugegeben, die Lösung durch leichtes Schnippen gegen das RG durchmischt und anschließend für 15 min bei RT inkubiert. Nach der Inkubation wurden 400 μ l W5-Puffer zu dem Transformationsansatz pipettiert und zentrifugiert (100 g, 5 min, RT). Der Überstand wurde vorsichtig entfernt und das Pellet in 1 ml PCA-Medium aufgenommen. Die Lösung wurde anschließend in eine 6-Well-Schale überführt. Diese wurde mit Parafilm versiegelt, in Aluminiumfolie eingewickelt und im Dunkeln über Nacht für mindestens 16 h bei RT inkubiert. Am Folgetag wurde der Erfolg der Protoplasten-Transformation am Fluoreszenzmikroskop überprüft. Nach zwei Tagen wurden die Protoplasten ein zweites Mal mikroskopiert. Die Inkubation wurde für maximal 48 h durchgeführt.

3.9 Extraktionsmethoden

3.9.1 Nicht-wässrige Fraktionierung

Die Nicht-wässrige Fraktionierung wurde verwendet, um die Zellkompartimente Zytosol, Vakuole und Chloroplasten aus den Mesophyllzellen der Blätter hoher Bäume der Arten *F. sylvatica* und *Q. robur* zu isolieren und ihren Anteil in den Zellen zu bestimmen. Die Auftrennung erfolgt hierbei entlang eines Dichtegradienten aus n-Heptan und Tetrachlorethylen (Riens *et al.*, 1991; Lohaus, 2019).

3.9.1.1 Fraktionierung der Zellkompartimente

Es wurden 4 g des gemörserten Blattmaterials (Abs. 3.2) für 4 Tage in einer Lyophylle bei -30°C und 4 Pa gefriergetrocknet. Anschließend wurden 200 mg des getrockneten Materials in 20 ml Lösung A resuspendiert. Diese Suspension wurde für den weiteren Aufschluss der Zellen für 95 s (5 s Puls, 5 s Pause) mit einem Ultraschallstab behandelt. Damit die Proben nicht überhitzen, wurden die Probengefäße auf Eis gelagert. Anschließend wurde die Suspension über ein Nylonnetz (20 μ m Porengröße) gefiltert. Das Nylonnetz wurde dreimal mit 10 ml n-Heptan gespült und das Filtrat zentrifugiert (3200 x g, 4°C, 10 min). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 3 ml Lösung A resuspendiert. Von dieser Suspension wurden vier 50 μ l Alliquots entnommen und jeweils in ein 2 ml RG überführt. Die Alliquots wurden in einem Vakuum-Konzentrator getrocknet (30 min, RT) und in einem Exsikkator gelagert. Diese

Lösungen wurden später genutzt, um die Aktivität der Markerenzyme und die Metabolit-Konzentrationen im Blattgewebe vor der Fraktionierung zu bestimmen.

Für die Vorbereitung des Dichte-Gradienten wurde Kammer A des Doppelkammer-Dichte-Gradientenmischers mit 6 ml Lösung A (geringe Dichte) und Kammer B mit 5 ml Lösung B (hohe Dichte) befüllt. Am Ausgang des Gradientenmischers wurde ein Falcon-Röhrchen platziert, welches mit 1 ml von Lösung A befüllt wurde, die anschließend mit 0,5 ml Tetrachlorethylen überschichtet wurde. An den Gradientenmischer wurde ein Teflonschlauch angelegt und das Gemisch aus Lösung A und B wurde durch diesen Schlauch in das Falcon-Röhrchen geleitet. Dadurch wurde der Dichte-Gradient gebildet. Nach Anlegung des Gradienten wurde dieser mit der Zellsuspension des Pflanzenmaterials beladen. Anschließend wurde das Falcon-Röhrchen zentrifugiert (5000 g, 4°C, 50 min), wobei Beschleunigung und Abbremsen der Zentrifuge abgestellt wurden, um eine Zerstörung des Gradienten zu vermeiden. Nach der Zentrifugation wurden insgesamt 6 Fraktionen in 15 ml Falcon-Röhrchen entnommen und das genaue Volumen jeder Fraktion notiert. Die Fraktion der Vakuole sammelt sich dabei im Bereich der höchsten Dichte, das Zytosol im Bereich der mittleren Dichte und die Chloroplasten im Bereich der niedrigsten Dichte. Jede der entnommenen Fraktionen wurde mit 10 ml n-Heptan versetzt und zentrifugiert (3200 g, 4°C, 10 min). Der Überstand wurde entnommen und das Pellet in 3 ml n-Heptan resuspendiert. Von diesen Suspensionen wurden jeweils 500 µl in ein 1,5 ml RG überführt. Die Lösungen wurden in einem Vakuum-Konzentrator getrocknet (30 min, RT) und in einem Exsikkator unter Luftausschluss gelagert.

Um die Mengen der Zellkompartimente Zytosol, Vakuole und Chloroplasten in den sechs entnommenen Fraktionen zu quantifizieren, wurden verschiedene Markerenzyme verwendet.

Zunächst wurden die getrockneten Aliquots (nicht-fraktioniertes und fraktioniertes Material) jeweils in 500 µl Extraktionspuffer resuspendiert, gevortext und 5 min auf Eis inkubiert. Nach erneutem Vortexen wurden die Proben zentrifugiert (13000 g, 4°C, 2 min) und die Überstände wurden für die Messung der Enzymaktivität der Markerenzyme verwendet.

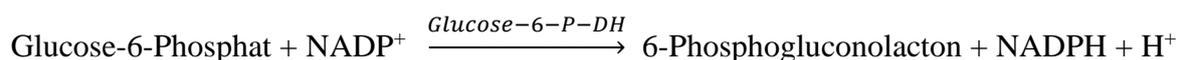
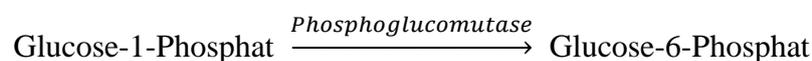
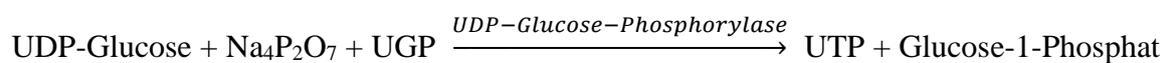
Tabelle 3.31 Lösungen für die NWF

| Lösung | Komponenten |
|-------------------|--|
| Lösung A | 67 % Tetrachlorethylen 33 % n-Heptan ($\sigma = 1,31 \text{ g/cm}^3$) |
| Lösung B | 83 % Tetrachlorethylen 17 % n-Heptan ($\sigma = 1,46 \text{ g/cm}^3$) |
| Extraktionspuffer | 50 mM HEPES pH 7,4 5mM MgCl ₂ 1 mM EDTA 0,1 % (v/v) Triton 10 % (v/v) Glycerin Ad 20 ml Reinstwasser |

Als Marker für die Bestimmung der Anteile der Zellkompartimente Zytosol, Vakuole und Chloroplasten in den Blatt-Mesophyllzellen wurden Enzyme verwendet, die jeweils ausschließlich in den einzelnen genannten Zellkompartimenten vorhanden sind.

3.9.1.2 UDP-Glucose Pyrophosphorylase für das Zytosol

Für die Bestimmung des Zytosol-Anteils wurde Uridin-Diphosphat-(UDP)-Glucose-Pyrophosphorylase verwendet (Zrenner *et al.*, 1993). Die Bestimmung basiert auf dem Anstieg der Absorption bei 334 nm aufgrund der Reduktion von NADP⁺.



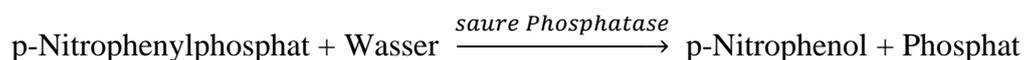
Für die Messung wurden 70 μl Probe in eine Küvette gegeben und mit Reaktionslösung versetzt. Danach wurde die für 2-3 min die Basislinie aufgenommen, die Reaktion anschließend mit dem Reaktionsstarter Natriumpyrophosphat ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$) gestartet und 15 min bei 340 nm gemessen.

Tabelle 3.32 Reaktionslösung für das UDP-Glucose-Assay

| Komponente | Konzentration |
|-------------------------|---------------|
| TRIS | 0,1 M |
| MgCl ₂ | 2 mM |
| NADP | 0,25 mM |
| NAF | 2 mM |
| Glucose-1,6-Bisphosphat | 20 µM |

3.9.1.3 Saure Phosphatase für die Vakuole

Für die Bestimmung des Anteils der Vakuole in den Fraktionen wurde die saure Phosphatase als Marker-Enzym verwendet. Diese Bestimmung basiert auf der Erhöhung der Absorption bei 405 nm aufgrund der Bildung von p-Nitrophenol (Li, 1967).



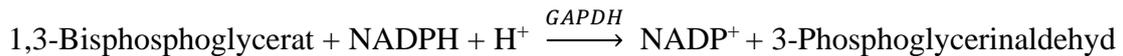
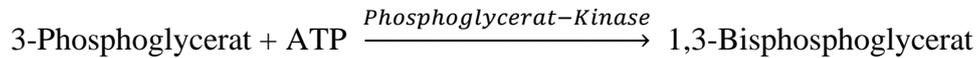
Für die Messung wurden in einem 2 ml RG 50 µl Probe mit 500 µl Citratpuffer (pH 5,5) versetzt. Für den Start der Reaktion wurden 500 µl p-Nitrophenylphosphat hinzugefügt und inkubiert (800 rpm, 37°C, 65 min). Die Reaktion wird mit 500 µl 0,8 M Borsäure (pH 9,8) gestoppt. Anschließend wurden die RG zentrifugiert (13000 g, 5 min), der Überstand wurde in eine Küvette überführt und die Absorption bei 405 nm gemessen. Für die Messung der Blindwerte werden 2 ml RG vorbereitet, in welche 500 µl 100 mM Natriumcitrat, 500 µl p-Nitrophenylphosphat und 500 µl 0,8 M Borsäure gegeben wurden. Es wurden 50 µl Probe hinzupipettiert, die Lösung zentrifugiert (13000 g, 5 min) und der Blindwert bei 405 nm gemessen.

Tabelle 3.33 Lösungen für das saure Phosphatase-Essay

| Lösung | Konzentration |
|-----------------------|---------------|
| Citratpuffer pH 4,5 | 100 mM |
| p-Nitrophenylphosphat | 10 mM |
| Borsäure pH 9,8 | 800 mM |

3.9.1.4 NADP abhängige GAPDH für die Chloroplasten

Die Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADP) abhängige Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) wurde als Markerenzym für die Chloroplasten verwendet. Diese Methode basiert auf der Abnahme der Absorption bei 340 nm durch die Oxidation von NADPH in zwei gekoppelten Reaktionen (Wirtz *et al.*, 1980).



Zu 20 µl Probe wurden 580 µl GAP-DH-Mix gegeben. Nach 5 min wird die Reaktion mit der Zugabe von 3-Phosphoglycerat (0,2 M) gestartet und die kontinuierliche Abnahme der Extinktion für 10 min gemessen. Als Blindwert diente der GAP-DH-Mix ohne Probe.

Tabelle 3.34 Lösungen für das GAP-DH-Essay

| Lösung | Komponenten |
|--------------|--|
| GAP-DH-Mix | 100 mM HEPES pH 8,0 30 mM MgCl ₂ 20 mM KCl 2 mM EDTA 6,7 mM DTT 6,7 mM ATP 0,3 mM NADPH 3,7 U/ µl Phosphoglycerat-Kinase |
| Start-Lösung | 0,2 M 3-Phosphoglycerat |

3.9.2 Extraktion wässriger Metabolite

Die Extraktion wässriger Metabolite für die HPLC Analysen und Stärke-Bestimmung erfolgte nach einem Protokoll von Göttinger *et al.* (2019).

Von dem gemörserten Probenmaterial (Abs. 3.2) wurden 150 bis 200 mg in ein Zentrifugenröhrchen eingewogen und die Proben mit 5 ml Chloroform/Methanol (1,5:3,5, v/v) versetzt. Die Suspension wurde für 20 s kräftig geschüttelt und anschließend 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit 3 ml Reinstwasser versetzt, zweimal für 10 s kräftig geschüttelt und zentrifugiert (4500 rpm, RT, 1 min). Die obere Phase wurde in einen Rundkolben überführt. Die verbliebene Suspension wurde erneut mit 2 ml Reinstwasser

versetzt und nochmals wie zuvor beschrieben extrahiert. Die obere Phase wurde abgenommen und mit der Oberphase aus der ersten Extraktion im Rundkolben vereinigt. Anschließend wurde der wässrige Inhalt des Rundkolbens im Rotationsverdampfer bei 40°C bis zur Trockene eingengt. Der feste Rückstand wurde in 1 ml Reinstwasser gelöst, mit einer Spitze aufgenommen und durch einen Spritzenfilter in ein 1,5 ml RG filtriert. Die Proben wurden bis zur HPLC-Analyse bei -20°C gelagert. Die Zentrifugenröhrchen, welche den festen Rückstand des Probenmaterials enthielten, wurden für die Analyse des Stärkegehaltes ebenfalls bei -20°C gelagert.

3.10 Bestimmung der Osmolalität

Für die Messung der Osmolalität wurden Blätter bzw. Nadeln in kleine Stücke geschnitten, in ein 2 ml RG platziert, bei -20°C eingefroren und wieder aufgetaut. Die Zellen der Blätter werden durch die beim Einfrieren entstandenen Wasserkristalle zerstört und der ausgetretene Zellsaft konnte somit gesammelt werden. Die Abtrennung des Zellsaftes aus der aufgetauten Suspension erfolgte durch Zentrifugation für 5 min bei 5000 x g. Die anschließende Messung der Osmolalität wurde an einem Osmometer (5100 B, Fa. Wescor) durchgeführt.

3.11 HPLC

3.11.1 Zucker

Die Bestimmung des Disaccharids Saccharose sowie der beiden Hexosen Glucose und Fructose erfolgte mittels der Hochleistungs-Flüssig-Chromatographie (engl.: *high-performance-liquid-chromatography*, HPLC). Die HPLC-Analyse richtete sich nach einem Protokoll von Lohaus und Schwerdtfeger (2014).

Tabelle 3.35 Zuckerbestimmung der Pflanzen-Organe

| Gerät | Name/Hersteller |
|------------|--|
| Gerätename | ICS5000, Thermo Fisher Scientific |
| Vorsäule | Carbopac™ PA10 4x50 mm Guard, Dionex, |
| Hauptsäule | Carbopac™ PA10 4x125 mm, Dionex, |
| Software | Chromeleon 7.2, Thermo Fisher Scientific |

Für die Messungen wurden die wässrigen Extrakte (Abs. 3.9.2) im Verhältnis 1:30 bzw. die Extrakte der Zellkompartimente (Abs. 3.9.1) im Verhältnis 1:5 mit Reinstwasser verdünnt, sodass sie im linearen Detektionsbereich der externen Kalibrierung lagen (25 – 250 µM). Die Kalibrierung wurde mit Glucose-, Fructose- und Saccharose-Standards durchgeführt, die

jeweils in Konzentrationen von 25, 50, 100 und 250 μM vorlagen. Die Detektion erfolgte mit einem Puls-amperometrischen Detektor mit einer Gold-Elektrode. Die Pulseinstellung lag bei 50, 700 und -800 mV für 400, 540 und 540 ms in jeder Messung. Als Laufmittel wurde 100 mM NaOH verwendet. Durch die NaOH werden die Analyten in ihre Anionen-Form überführt. Die Auftrennung der Anionen-Austauscher-Säule (stationäre Phase) erfolgte über die Anzahl der negativen Ladungen der Zuckermoleküle (mobile Phase). Die Flussrate des Laufmittels lag bei 0,8 ml/min und die Elution wurde isokratisch durchgeführt.

3.11.2 Anorganische Ionen

Die Messung der anorganischen Anionen und Kationen erfolgte in zwei separaten HPLC-Methoden nach Göttlinger und Lohaus (2022). Für die Analyse wurden die Proben aus der Extraktion der wässrigen Metabolite verwendet (Abs. 3.9.2).

Für die Kationen wurden die folgenden Geräte benutzt:

Tabelle 3.36 Anorganische Kationen

| Gerät | Name/Hersteller |
|-------------|---|
| Gerätename | ICS1000, Dionex |
| Vorsäule | IonPac© CG12A 4x50 mm, Dionex |
| Hauptsäule | IonPac© CG12A 4x250 mm, Dionex |
| Detektor | DS6 Heated Conductivity Cell, Dionex |
| Autosampler | ASI-100 Automated Sample Injector, Dionex |
| Software | Chromeleon 7.2, Thermo Fisher Scientific |

Als Laufmittel für die anorganischen Kationen wurde 15 mM H_2SO_4 verwendet. Die Trennung der Kationen erfolgte über eine Kationenaustauscher-Säule, die Elution wurde isokratisch durchgeführt mit einer Flussrate von 1 ml/min. Es wurde eine externe Kalibrierung durchgeführt, wobei ein Standard bestehend aus den Kationen Na^+ , NH_4^+ , K^+ , Mg^{2+} und Ca^{2+} verwendet wurde. Die Standards hatten Konzentrationen von 100, 250, 500, 750 und 1000 μM . Die Detektion erfolgte konduktometrisch.

Für die Anionen wurden die folgenden Geräte verwendet:

Tabelle 3.37 Anorganische Anionen

| Gerät | Name/Hersteller |
|-------------|--|
| Gerätename | ICS1000, Dionex |
| Vorsäule | IonPac© AG11 4x50 mm, Dionex |
| Hauptsäule | IonPac© AS11 4x250 mm, Dionex |
| Detektor | CD20 Conductivity-Detektor, Model DS3-1, Dionex |
| Autosampler | As 3500, Dionex |
| Software | PeakNet 5.1, Dionex |

Bei der Messung der Anionen wurde NaOH eingesetzt, wobei die Elution über einen Gradienten erfolgte (4-77 mM, Flussrate 2 ml/min). Die Analyten wurden über eine Anionenaustauscher-Säule getrennt. Wie bei der Analyse der Kationen wurde eine externe Kalibrierung mit Standardlösungen durchgeführt, welche die Anionen Cl^- , NO_3^- , PO_4^{3-} , SO_4^{2-} und Malat enthielten. Es wurden Kalibrierlösungen mit den Konzentrationen 100, 250, 500, 750 und 1000 μM gemessen. Die Detektion erfolgte ebenfalls konduktometrisch.

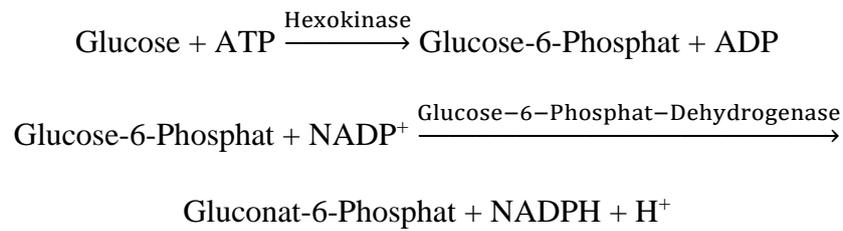
3.12 Photometrische Bestimmung von Stärke

Die Bestimmung von Stärke erfolgte mit dem festen Rückstand in den Zentrifugenröhrchen aus der Extraktion wässriger Metabolite (Abs. 3.9.2) nach einem modifizierten Protokoll nach Riens *et al.* (1994).

Um das Chloroform aus der Extraktion sowie Chlorophyll zu entfernen, wurde der Rückstand in den Zentrifugenröhrchen mit 5 ml 96%igem Ethanol versetzt. Die Proben wurden kräftig geschüttelt und anschließend zentrifugiert (4500 rpm, 5 min). Der Überstand wurde vorsichtig abgegossen und das Pellet in 2 ml 0,2 M KOH resuspendiert. Im Wasserbad wurden die Proben für 3 h bei 80°C inkubiert und anschließend mit 350 μl 1 M Essigsäure versetzt, um den pH-Wert auf 4,5-5,0 einzustellen. Für die enzymatische Bestimmung der Stärke am folgenden Tag wurden die Proben bei -20°C gelagert.

Für die enzymatische Aufspaltung der Stärke in den Proben wurden in einem 1,5 ml RG 100 μl Probe mit 400 μl Reaktionsmedium versetzt und für mindestens 4 h bei 55°C im Wasserbad inkubiert. Die Proben wurden anschließend zentrifugiert (13000 rpm, 2 min) und für die optisch-enzymatische Glucosebestimmung bei -20°C gelagert.

Die photometrische Bestimmung der Glucose beruht auf dem folgenden Messprinzip:



Für die photometrische Messung wurden in einer Einmalküvette 10 µl Probe mit 690 µl Mastermix versetzt, mit einem Glasspatel gerührt und die Anfangs-Extinktion bei 334 nm gegen Luft gemessen. Die Proben wurden anschließend mit 5 µl Hexokinase/Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase versetzt, mit einem Glasspatel umgerührt und 10 min inkubiert. Die End-Extinktion wurde erneut bei 334 nm gegen Luft gemessen.

Tabelle 3.38 Lösungen für die photometrische Stärke-Bestimmung

| Lösung | Komponenten |
|---|--|
| Reaktionsmedium für die Stärkeaufspaltung | 50 mM Natriumacetat pH 4,8 2 U α-Amylase 1,4 U Amyloglukosidase |
| Mastermix für die Glucose-Bestimmung | 100 mM TRIS-HCl pH 8,0 3 mM MgCl ₂ 1,5 mM ATP 0,5 mM NADP ⁺ |

3.13 Software, Webserver und Genomdatenbanken

Die folgende Tabelle enthält eine Auflistung sämtlicher, in dieser Arbeit verwendeter Software. Die entsprechenden Internetadressen befinden sich im Anhang.

Tabelle 3.39 Software und Webserver

| Name | Version | Funktion | Referenz |
|-----------------------|----------------|---|--|
| Agilent Aria | 1.71 | qPCR | |
| Bioedit | 7.2.5.0 | Sequenzalignment | Hall, 1999 |
| Blast | | Sequenzvergleich | Altschul <i>et al.</i> , 1997 |
| Chromeleon | 7.2 | Analyse von Zuckern und Kationen | |
| Deep TMHMM | 1.0.19 | Transmembrandomänenvorhersage | Krogh <i>et al.</i> , 2001; Hallgren <i>et al.</i> , 2022 |
| Expasy | | <i>in silico</i> Translation | |
| GenBank | | Sequenzdatenbank | Benson <i>et al.</i> , 2013 |
| MEGA 11 | 11.0.11 | Phylogenetische Analyse | Tamura <i>et al.</i> , 2021 |
| PeakNET | 5.1 | Analyse von Anionen | |
| Perl Primer | 1.1.21 | Generierung von Primern | Marshall, 2004 |
| Primer 3 | 4.1.0 | Generierung von Primern | Untergasser <i>et al.</i> , 2012 |
| Protter | 1.0 | Visualisierung von Proteinen | Omasits <i>et al.</i> , 2014 |
| Reverse complement | | Generierung von Komplementär- strängen | Stothard, 2000 |
| ZEN | 3.4.91 | Bearbeitung von mikroskopischen Fotos | |

Für die Suche nach genomischen Sequenzen, cDNA oder Proteinsequenzen spezifischer Gene wurden Genomdatenbanken verwendet. Diese waren entweder für einen bestimmten Organismus, für mehrere Organismen oder für spezifische Proteine angelegt, die in den meisten Eukaryoten vorhanden sind.

Tabelle 3.40 Genomdatenbanken

| Organismus/Protein | Web-Adresse | Referenz |
|------------------------|---|-------------------------------------|
| <i>Fagus sylvatica</i> | http://thines-lab.senckenberg.de/beechnome/index2_newv2.html | Mishra <i>et al.</i> , 2018 |
| <i>Quercus robur</i> | https://urgi.versailles.inra.fr/blast/ | Deng <i>et al.</i> , 2007 |
| <i>P. abies</i> | https://congenie.org/start | Nystedt <i>et al.</i> , 2013 |
| SWEET | https://phytozome-next.jgi.doe.gov/blast-search | Goodstein <i>et al.</i> , 2012 |
| | https://www.ebi.ac.uk/interpro/ | Paysan-Lafosse <i>et al.</i> , 2023 |

3.14 Statistik

Für die Auswertung der SUT-Expression sowie für die Messungen von Zuckern, anorganischen Ionen und Stärke, bei welchen die statistische Signifikanz zweier Gruppen miteinander verglichen wurde, kam ein gepaarter Student-t-Test zur Anwendung. Signifikante Veränderungen sind mit Sternchen gekennzeichnet ($p \leq 0,05 = *$; $p \leq 0,01 = **$; $p \leq 0,001 = ***$).

Die Varianzanalyse (ANOVA) gefolgt von einem *Post-hoc*-Test (*Tukey's* HSD; $p \leq 0,05$) wurde durchgeführt, wenn drei oder mehr Gruppen hinsichtlich statistisch signifikanter Unterschiede miteinander verglichen wurden. Signifikante Unterschiede sind hier mit Buchstaben gekennzeichnet.

4. Ergebnisse

Der Ergebnisteil ist in die folgenden Abschnitte gegliedert:

- Abschnitt 4.1** NSC-Gehalte, anorganische Ionen und Osmolalitäten in kleinen und hohen Bäumen von *F. sylvatica*, *Q. robur* und *P. abies*
- Abschnitt 4.2** Subzelluläre Verteilung von Zuckern in den Zellkompartimenten Zytosol, Vakuole und Chloroplasten (Stroma) in hohen *F. sylvatica* und *Q. robur*
- Abschnitt 4.3** Neue Saccharose-Transporter aus *F. sylvatica*, SWEET12 aus *Q. robur* sowie phylogenetische Analyse von SUTs und SWEETs
- Abschnitt 4.4** Gewebespezifische Expression von Saccharose-Transportern in *F. sylvatica*, *Q. robur* und *P. abies*, sowie Charakterisierung von Saccharose-Transportern aus *F. sylvatica* und *Q. robur* durch heterologe Expression in *S. cerevisiae*; zellspezifische Expression von Saccharose-Transportern durch *in-situ*-Hybridisierung in *F. sylvatica* und *P. abies*

Teile der genannten Abschnitte der Ergebnisse wurden im Magazin *Tree Physiology* unter dem Titel „**Sugar concentration and expression of SUTs suggest active phloem loading in tall trees of *Fagus sylvatica* und *Quercus robur***“ (Miehe et al. 2023; In: *Tree physiology* 43 (5), S. 805 – 816. DOI: 10.1093/treephys/tpac152) publiziert.

4.1 NSC-Gehalte und anorganische Ionen in *F. sylvatica*, *Q. robur* und *P. abies*

Im folgenden Abschnitt sind die Gehalte von Zuckern und Stärke (NSC-Gehalte) sowie die Gehalte von anorganischen Ionen in den Organen Blatt, Rinde und Holz in kleinen und hohen Bäumen der Arten *F. sylvatica*, *Q. robur* und *P. abies* gezeigt. In der Auswertung wurde der Gesamtgehalt an Glucose und Fructose als Hexosen zusammengefasst. Für die Darstellung der Kationen sind Natrium (Na⁺), Calcium (Ca²⁺) und Magnesium (Mg²⁺) aufgrund ihrer geringen Konzentrationen als Summe zusammengefasst, Kalium (K⁺) wird einzeln betrachtet. Bei der Auswertung der Anionen wurde die Summe aus Nitrat (NO₃⁻) und Phosphat (PO₄³⁻) gebildet, wohingegen Chlorid (Cl⁻) aufgrund seiner hohen Konzentration in den Proben als einzelner Parameter dargestellt ist.

4.1.1 *Fagus sylvatica*

Die folgende Abbildung zeigt die Ergebnisse der NSC-Untersuchungen sowie anorganische Anionen und Kationen in kleinen und hohen *F. sylvatica*.

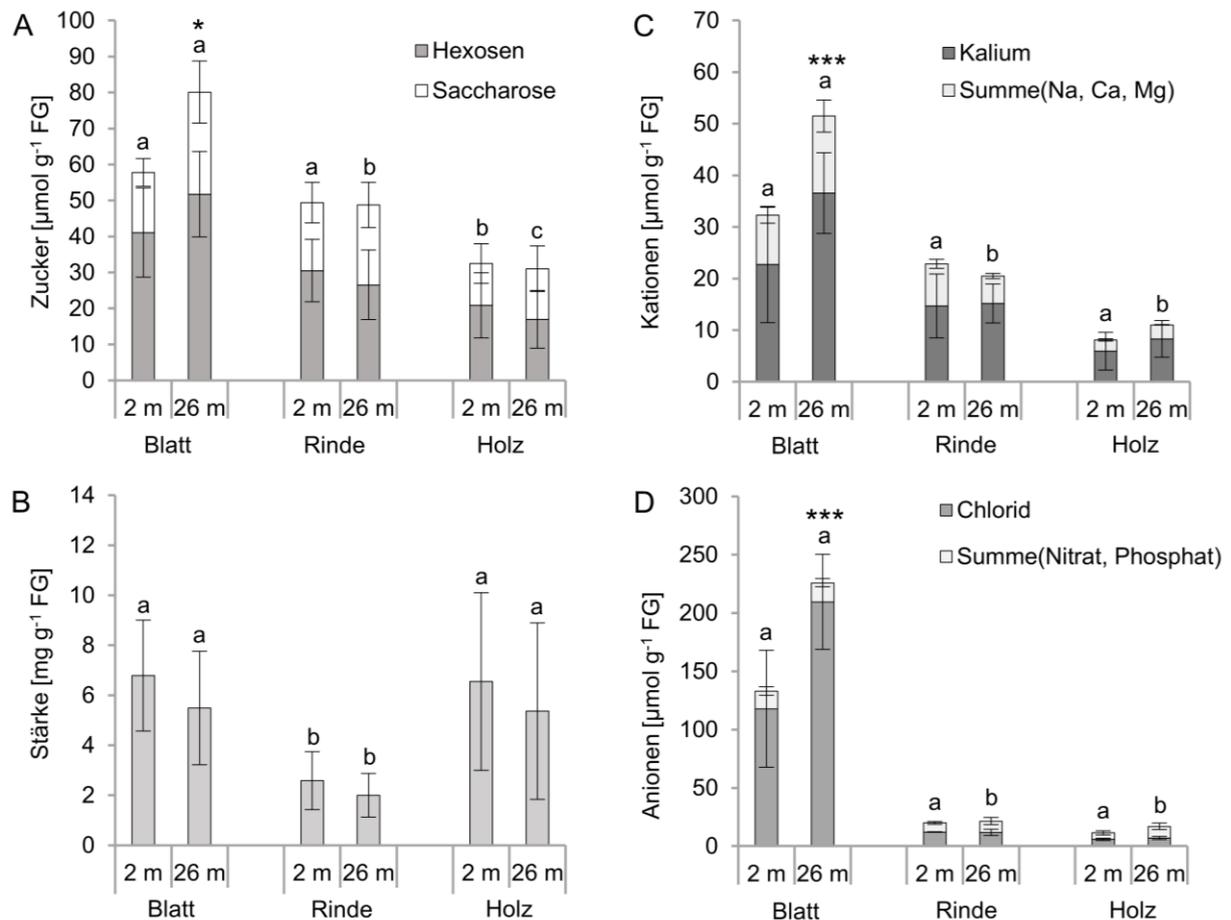


Abbildung 4.1 Organspezifischen NSC-Gehalte und anorganische Ionen in kleinen und hohen *F. sylvatica*. A und B: Konzentration von Hexosen und Saccharose sowie Gehalt von Stärke. C und D: Konzentration von anorganischen Kationen und Anionen. Signifikante Änderungen in den Gesamtzucker-, Gesamtkationen und Gesamtanionen-Konzentrationen bzw. Stärkegehalten in den einzelnen Organen (z.B. Gehalte in Blätter von kleinen Bäumen im Vergleich zu Blättern von hohen Bäumen) wurden mit einem gepaarten t-Test untersucht und sind mit Sternchen gekennzeichnet ($p \leq 0,05 = *$; $p \leq 0,01 = **$; $p \leq 0,001 = ***$). Die verschiedenen Buchstaben repräsentieren signifikante Änderungen der Gesamtzucker-, Gesamtkationen- und Gesamtanionen-Konzentrationen bzw. Stärkegehalte zwischen Blättern, Rinde und Holz (*Tukey's HSD*, $p \leq 0,05$). Die Gehalte in kleinen und hohen Bäumen wurden hierbei separat verglichen, $n = 6$.

Bei der Untersuchung der gelösten Zucker (Abbildung 4.1 A) konnten die beiden Hexosen Glucose und Fructose sowie Saccharose in allen untersuchten Geweben als Hauptzucker identifiziert werden. Der Gesamtzuckergehalt war dabei am höchsten in Blättern (58 – 80 μmol g⁻¹ FG), gefolgt von Rinde (49 μmol g⁻¹ FG) und Holz (32 μmol g⁻¹ FG). Die Zuckergehalte in

kleinen und hohen Bäumen zeigten ebenfalls Werte in ähnlicher Höhe. Einzig in den Blättern hoher Bäume von *F. sylvatica* (26 m) zeigte sich ein signifikant höherer Zuckergehalt ($p < 0,05$) als in Blättern von kleinen Bäumen (2 m). Die Stärkegehalte (Abbildung 4.1 B) zeigten in Blättern ($5,5 - 6,8 \text{ mg g}^{-1} \text{ FG}$) und Holz ($5,4 - 6,5 \text{ mg g}^{-1} \text{ FG}$) sowohl in hohen als auch in niedrigen Bäumen ähnliche Werte. Signifikant niedriger waren die Stärkegehalte in der Rinde ($2,0 - 2,6 \text{ mg g}^{-1} \text{ FG}$) in beiden gemessenen Höhen. Im organspezifischen Vergleich zwischen beiden Wachstumshöhen der jeweiligen Organe wurden keine signifikanten Änderungen festgestellt.

Die höchsten Gesamtkationen-Konzentrationen (Abbildung 4.1 C) waren in beiden Wachstumshöhen in den Blättern vorhanden ($33 - 52 \text{ } \mu\text{mol g}^{-1} \text{ FG}$), gefolgt von Rinde ($20 - 23 \text{ } \mu\text{mol g}^{-1} \text{ FG}$) und Holz ($8 - 11 \text{ } \mu\text{mol g}^{-1} \text{ FG}$). Eine signifikante Änderung der Gesamtkonzentration der Kationen bei kleinen (2 m) im Vergleich zu hohen Bäumen (26 m) trat bei Blättern auf, wobei die Blätter der hohen Bäume signifikant höhere Konzentrationen aufwiesen ($p < 0,001$). Insgesamt war die Gesamtkonzentration der Kationen in Blättern hoher Bäume im Vergleich zu jenen in Rinde und Holz signifikant erhöht. Bei der Messung der anorganischen Anionen (Abbildung 4.1 D) waren die höchsten Anionen-Konzentrationen (Summe) in den Blättern beider Bäume vorhanden ($133 - 225 \text{ } \mu\text{mol g}^{-1} \text{ FG}$). Der Gehalt der Anionen lag in der Rinde in beiden Wachstumshöhen zwischen 20 und $22 \text{ } \mu\text{mol g}^{-1} \text{ FG}$ und bei Holz zwischen 12 und $17 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \text{ FG}$. Bei Betrachtung der Änderung der Gesamtanionen-Konzentration mit der Wachstumshöhe war eine signifikante Erhöhung der Konzentration bei Blättern hoher Bäume (26 m) im Vergleich zu den Blättern kleiner Bäume (2 m) zu beobachten ($p < 0,001$). Bei hohen Bäumen war die Konzentration der Anionen in Blättern signifikant höher im Vergleich zu Rinde und Holz.

4.1.2 *Quercus robur*

Die folgende Abbildung zeigt die Ergebnisse der NSC-Untersuchungen sowie der anorganischen Kationen und Anionen in *Q. robur*.

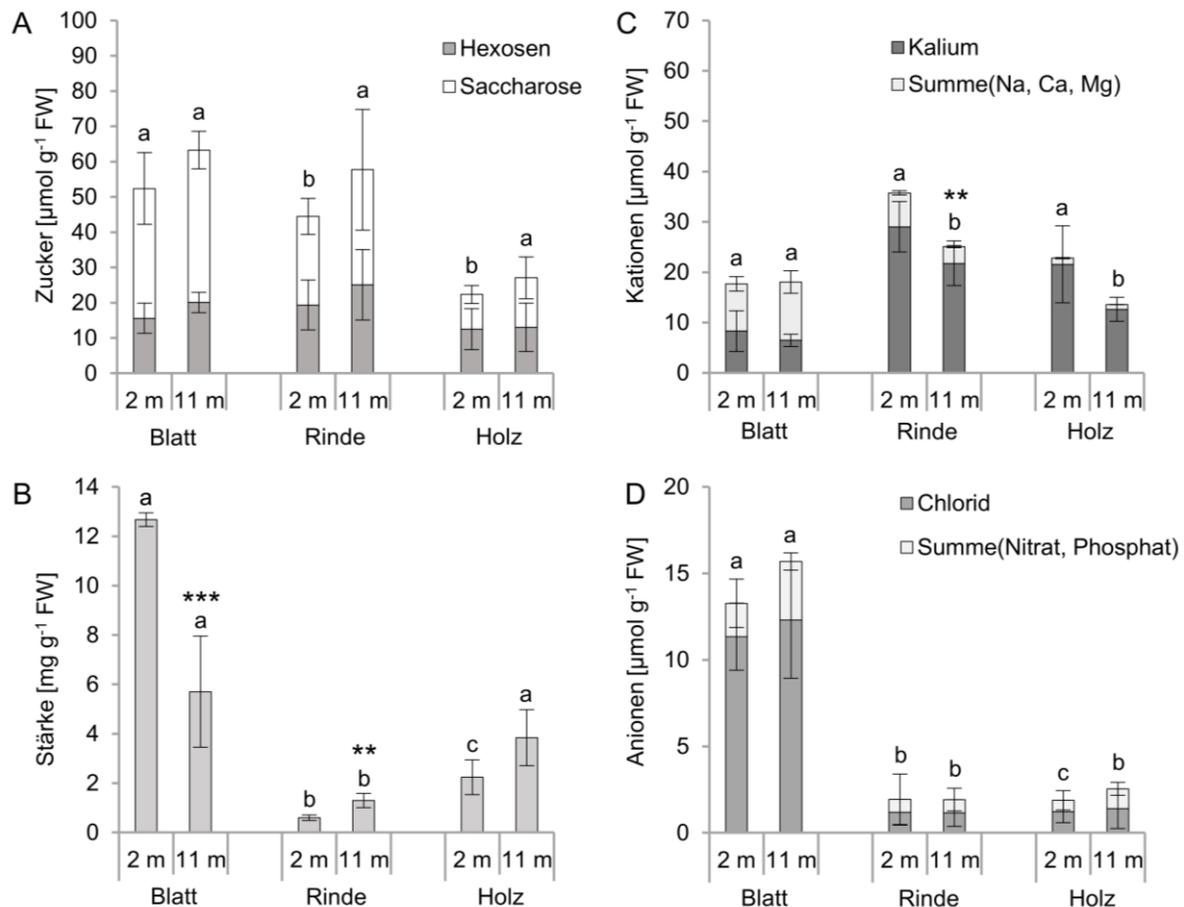


Abbildung 4.2 Organ-spezifische NSC-Gehalte und anorganische Ionen in kleinen und hohen *Q. robur*. A und B: Konzentration von Hexosen und Saccharose sowie Gehalt von Stärke. C und D: Konzentration von anorganischen Kationen und Anionen. Signifikante Änderungen in den Gesamtzucker-, Gesamtkationen und Gesamtanionen- Konzentrationen bzw. Stärkegehalten in den einzelnen Organen (z.B. Gehalte in Blätter von kleinen Bäumen im Vergleich zu Blättern von hohen Bäumen) wurden mit einem gepaarten t-Test untersucht und sind mit Sternchen gekennzeichnet ($p \leq 0,05 = *$; $p \leq 0,01 = **$; $p \leq 0,001 = ***$). Die verschiedenen Buchstaben repräsentieren signifikante Änderungen der Gesamtzucker-, Gesamtkationen- und Gesamtanionen-Konzentrationen bzw. Stärkegehalten zwischen Blättern, Rinde und Holz (Tukey's HSD, $p \leq 0,05$). Die Gehalte in kleinen und hohen Bäumen wurden hierbei separat verglichen, $n = 6$.

In *Q. robur* lag der Gesamtzucker-gehalt (Abbildung 4.2 A) in Blättern ($52 - 63 \mu\text{mol g}^{-1}$ FG) und Rinde ($44 - 58 \mu\text{mol g}^{-1}$ FG) in einem ähnlichen Bereich. Für Holz lagen die Konzentrationen zwischen $22 - 27 \mu\text{mol g}^{-1}$ FG.

Der Stärkegehalt (Abbildung 4.2 B) zeigte sich in Blättern am höchsten ($5,7 - 12,7 \text{ mg g}^{-1} \text{ FG}$), gefolgt von Holz ($2,2 - 3,8 \text{ mg g}^{-1} \text{ FG}$) und Rinde ($0,6 - 1,3 \text{ mg g}^{-1} \text{ FG}$). Signifikante Änderungen zeigten sich im Stärkegehalt in Blättern von kleinen im Vergleich zu hohen Bäumen. Hierbei wurde in Blättern kleiner Bäume (2 m) ein signifikant höherer Gehalt ($p < 0,001$) gemessen als in den Blättern hoher Bäume (11 m). In Rinde wurde hingegen in den Proben der hohen Bäume ein signifikant höherer Stärkegehalt ($p < 0,01$) gemessen als in den Proben der kleinen Bäume.

Die anorganischen Kationen (Abbildung 4.2 C) zeigten in Rinde ($25 - 36 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ FG}$) die höchste Konzentration und geringfügig niedriger lag diese im Holz ($14 - 23 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ FG}$). In Blättern waren die Gesamtkationen-Konzentrationen am geringsten ($17 - 18 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ FG}$). Signifikante Änderungen des Gesamtkationengehaltes bei kleinen (2 m) im Vergleich zu hohen Bäumen (11 m) traten bei Rinde auf, wobei hier Gesamtkonzentration der Kationen in hohen Bäumen signifikant niedriger war als in kleinen Bäumen ($p < 0,01$).

Bei der Messung der anorganischen Anionen (Abbildung 4.2 D) waren die höchsten Anionen-Konzentrationen (Summe) in beiden Höhen in den Blättern vorhanden ($13 - 15 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ FG}$). In Rinde und Holz lag die Konzentration bei $2 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ FG}$. Bei kleinen und hohen Bäumen war die Konzentration der Anionen in Blättern signifikant höher im Vergleich zu Rinde und Holz.

4.1.3 *Picea abies*

Ebenso wie bei den beiden Laubbäumen *F. sylvatica* und *Q. robur* wurde der Einfluss der Wachstumshöhe auf die Zusammensetzung der wässrigen Metabolite (Zucker, anorganische Ionen) sowie auf den Stärkegehalt bei kleinen und hohen Bäumen der Konifere *Picea abies* untersucht. Die Ergebnisse sind in der folgenden Abbildung gezeigt.

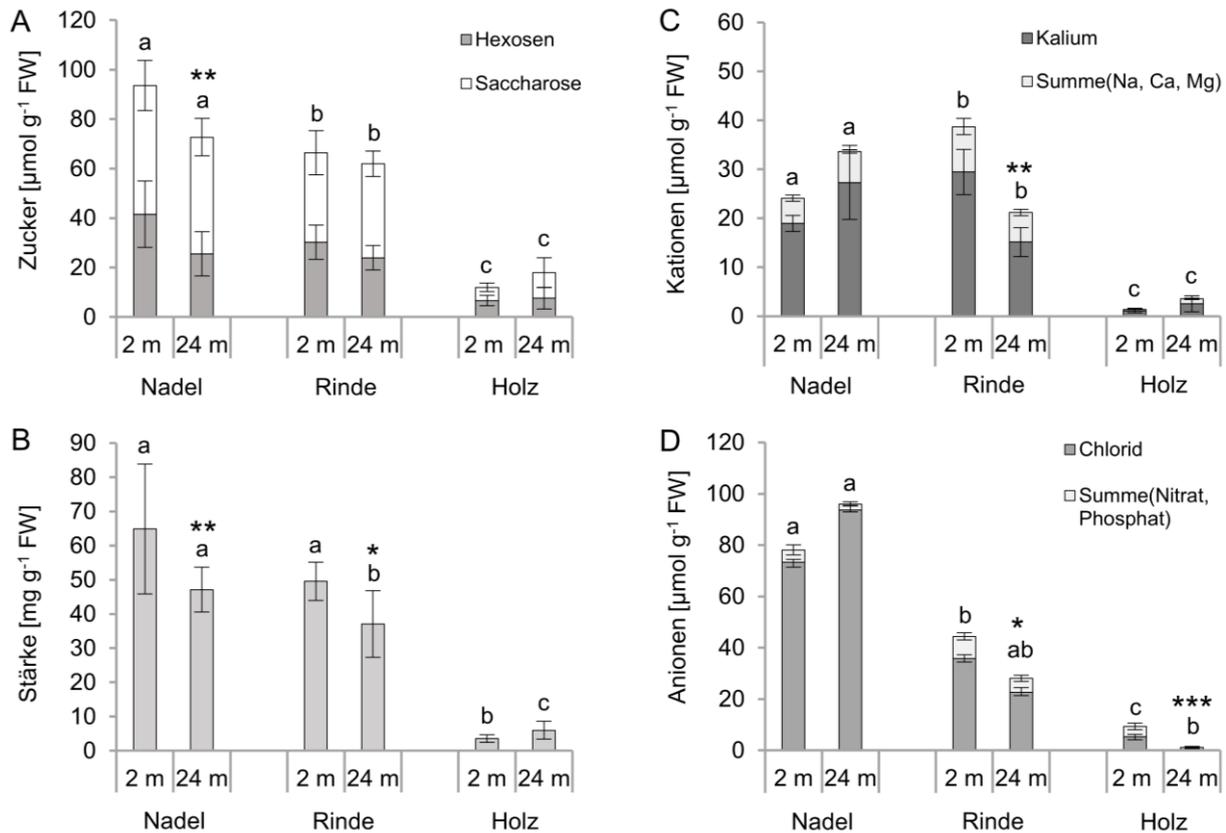


Abbildung 4.3 Organ-spezifische NSC-Gehalte und anorganische Kationen und Anionen in kleinen und hohen *P. abies*. Signifikante Änderungen in den Gesamtzuckerkonzentrationen (A), Stärkegehalten (B) sowie in den Gesamtkationen- (C)-bzw. Gesamtanionen-Konzentrationen (D) in den einzelnen Organen (z.B. Gehalte in Blätter von kleinen Bäumen im Vergleich zu Blättern von hohen Bäumen) wurden mit einem gepaarten t-Test untersucht und sind mit Sternchen gekennzeichnet ($p \leq 0,05 = *$; $p \leq 0,01 = **$; $p \leq 0,001 = ***$). Die verschiedenen Buchstaben repräsentieren signifikante Änderungen der Gesamtzuckerkonzentrationen und Stärkegehalten sowie der Gesamtkationen-bzw. Gesamtanionen-Konzentrationen zwischen Blättern, Rinde und Holz (*Tukey's HSD*, $p \leq 0,05$). Die Gehalte in kleinen und hohen Bäumen wurden hierbei separat verglichen, $n = 6$.

In der Analyse der gelösten Zucker konnten, wie bereits bei den Laubbäumen, die beiden Hexosen Glucose und Fructose sowie Saccharose als Hauptzucker identifiziert werden (Abbildung 4.3 A). Die höchsten Gesamtzuckeranteile wurden in Nadeln gemessen (72 – 94 µmol g⁻¹ FW), wobei der Gehalt in Nadeln von hohen Bäumen (24 m) signifikant niedriger war

($p < 0,001$) als in Nadeln von kleinen Bäumen (2 m). In Rinde lag der Gesamtzucker Gehalt zwischen 62 und 66 $\mu\text{mol g}^{-1}$ FG und in Holz zwischen 12 und 18 $\mu\text{mol g}^{-1}$ FG. Die Gesamtzucker Gehalte wiesen zwischen allen drei gemessenen Gruppen signifikante Unterschiede auf.

Die Stärke Gehalte (Abbildung 4.3 B) waren in Nadeln am höchsten (47 – 65 mg g^{-1} FG), gefolgt von Rinde (37 – 50 mg g^{-1} FG) und Holz (4 – 6 mg g^{-1} FG). Signifikante Unterschiede zwischen den Organen kleiner Bäume und hoher Bäume zeigten sich bei Nadeln und Rinde, wobei der Stärke Gehalt in den Proben der hohen Bäume jeweils signifikant niedriger war ($p < 0,01$ bei Nadeln, $p < 0,05$ bei Holz).

Als anorganische Ionen konnte Kalium in *P. abies* als Hauptkation sowie Chlorid als Hauptanion identifiziert werden (Abbildung 4.3 C). Der Gesamt-Kationengehalt lag in Nadeln zwischen 24 und 33 $\mu\text{mol g}^{-1}$ FG sowie in Rinde zwischen 38 und 21 $\mu\text{mol g}^{-1}$ FG. In der Rinde von hohen Bäumen lag der Kationengehalt signifikant niedriger ($p < 0,01$) als in der Rinde kleiner Bäume. Im Holz wurden die niedrigsten Mengen anorganischer Kationen gemessen (1 – 4 $\mu\text{mol g}^{-1}$ FG). Signifikante Unterschiede in der Kationenkonzentration zeigten sich sowohl bei kleinen als auch bei hohen Bäumen zwischen allen untersuchten Organen.

Die höchsten Anionen-Konzentrationen (Abbildung 4.3 D) wurden in Nadeln gemessen (78 – 96 $\mu\text{mol g}^{-1}$ FG). Bei Rinde lagen die Konzentrationen zwischen 28 und 45 $\mu\text{mol g}^{-1}$ FG. Die niedrigsten Konzentrationen wurden im Holz gemessen (1 – 9 $\mu\text{mol g}^{-1}$ FG). Die Gesamtanionen-Konzentration lag bei Rinde und Holz in den Proben der hohen Bäume signifikant niedriger im Vergleich zu den Proben kleiner Bäume ($p < 0,05$ bei Rinde, $p < 0,001$ bei Holz).

4.1.4 Osmolalitäten in Blattproben unterschiedlicher Wachstumshöhen

Die Osmolalität beschreibt die Konzentration aller gelösten osmotisch aktiven Teilchen einer Lösung bezogen auf 1 kg Lösungsmittel. Sie wurde für den Gesamtblattsaft von Blättern bzw. Nadeln kleiner und hoher Bäume von *F. sylvatica*, *Q. robur* und *Picea abies* bestimmt.

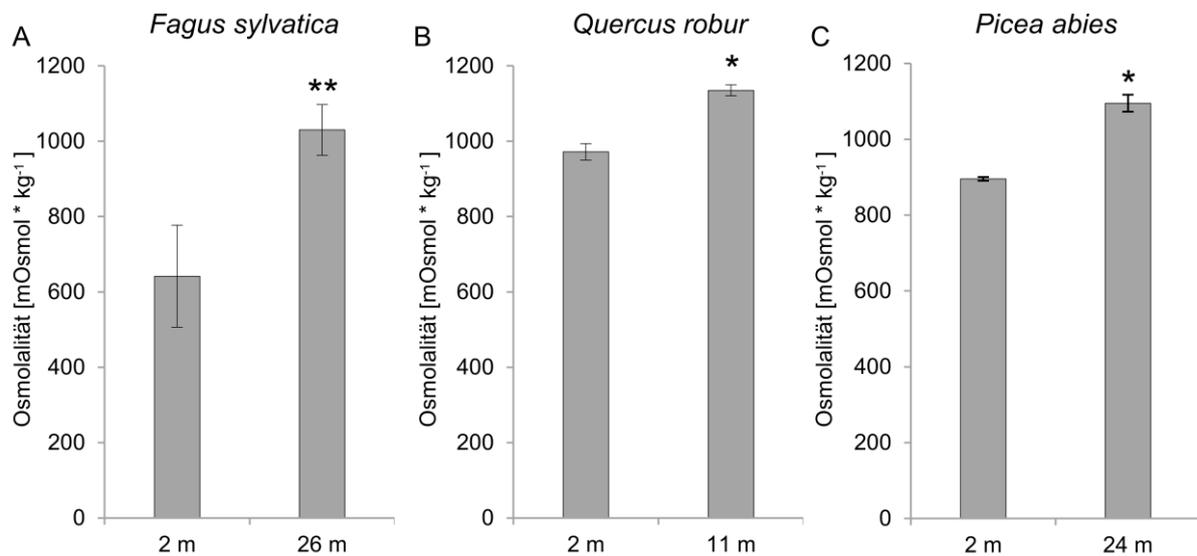


Abbildung 4.4 Vergleich der Osmolalitäten von Blattproben kleiner und hoher Bäume von *F. sylvatica*, *Q. robur* und *P. abies*. **A:** Osmolalität des Blattsaftes kleiner Bäume (2 m) im Vergleich zur Osmolalität des Blattsaftes hoher Bäume (26 m) aus *F. sylvatica*. **B:** Osmolalität des Blattsaftes kleiner Bäume (2 m) im Vergleich zur Osmolalität des Blattsaftes hoher Bäume (11 m) von *Q. robur*. **C:** Osmolalität des Blattsaftes kleiner Bäume (2 m) im Vergleich zur Osmolalität des Blattsaftes hoher Bäume (24 m) von *P. abies*. Signifikante Änderungen der Osmolalitäten von kleinen Bäumen im Vergleich zu hohen Bäumen wurden über einen gepaarten t-Test untersucht und sind mit Sternchen gekennzeichnet ($p \leq 0,05 = *$; $p \leq 0,01 = **$; $p \leq 0,001 = ***$), $n = 3$.

In Abbildung 4.4 ist zu erkennen, dass die Osmolalitäten in hohen Bäumen bei allen drei untersuchten Arten signifikant höher lagen als in kleinen Bäumen. In den kleinen Bäumen lagen die Osmolalitäten bei 642 mOsmol/kg in *F. sylvatica*, 972 mOsmol/kg in *Q. robur* und 895 mOsmol/kg in *P. abies*. In den hohen Bäumen lag der Mittelwert der Osmolalität in *Q. robur* mit 1135 mOsmol/kg am höchsten, gefolgt von *F. sylvatica* mit einem Wert von 1030 und *P. abies* mit 1095 mOsmol/kg.

4.2 Subzelluläre Verteilung von Zuckern zwischen Zellkompartimenten aus Blättern hoher Bäume von *F. sylvatica* und *Q. robur*

Die folgende Abbildung zeigt die Verteilung von Hexosen und Saccharose in den Zellkompartimenten Vakuole, Chloroplasten und Zytosol aus Blatt-Mesophyllzellen von *F. sylvatica* und *Q. robur*. Die beiden Monosaccharide Glucose und Fructose sind als Hexosen zusammengefasst.

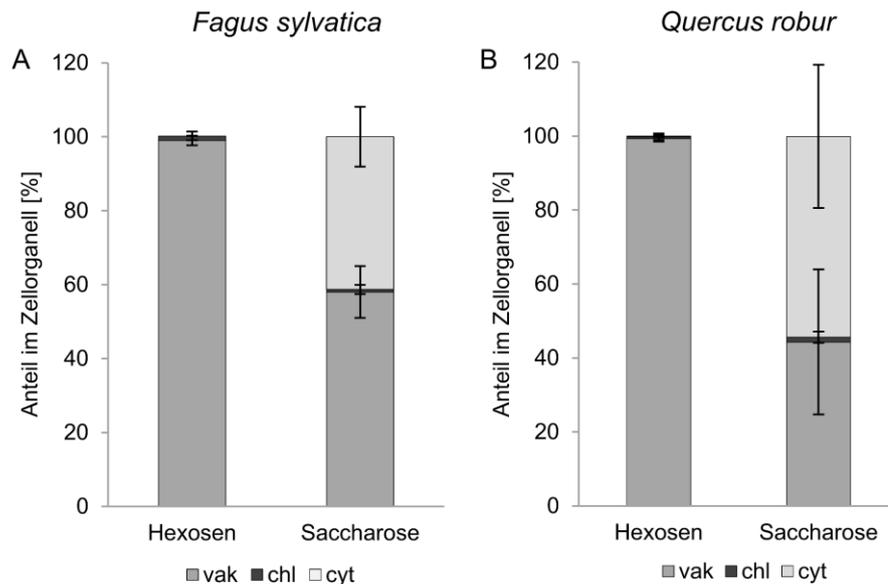


Abbildung 4.5 Subzelluläre Verteilung von Zuckern in Vakuole, Chloroplasten (Stroma) und Zytosol aus Blatt- Mesophyllzellen hoher Bäume von *F. sylvatica* und *Q. robur*. **A:** Subzelluläre Verteilung von Hexosen und Saccharose in *F. sylvatica*. **B:** Subzelluläre Verteilung von Hexosen und Saccharose in *Q. robur*. Die Daten setzen sich jeweils aus den Mittelwerten der drei untersuchten Zellorganell-Fraktionen (vak. = Vakuole; chl. = Chloroplasten (Stroma); cyt. = Zytosol) ± Standardabweichung zusammen, n = 3.

Die Hexosen Glucose und Fructose sowie Saccharose zeigten in den Zellkompartimenten Vakuole, Chloroplasten und Zytosol in beiden Baumarten eine ähnliche Verteilung. Die Hexosen waren nahezu vollständig in der Vakuole vorhanden. Hingegen war Saccharose in beiden Bäumen hauptsächlich zwischen der Vakuole (58 % bei *F. sylvatica* und 44 % bei *Q. robur*) und dem Zytosol (41 % bei *F. sylvatica* und 54 % bei *Q. robur*) verteilt. Im Stroma der Chloroplasten war der prozentuale Anteil an Hexosen und Saccharose hingegen sehr gering.

Die Volumina der Zellkompartimente sowie die Wassergehalte der Blatt-Mesophyllzellen beider Bäume sind in folgender Tabelle aufgeführt.

Tabelle 4.1 Wassergehalt und Volumina der subzellulären Kompartimente von Blatt-Mesophyllzellen aus *F. sylvatica* und *Q. robur*

| | <i>F. sylvatica</i> | <i>Q. robur</i> |
|---|---------------------|-----------------|
| Wassergehalt [$\mu\text{l g}^{-1}$ FG] | 510 \pm 30 | 540 \pm 28 |
| Vakuole [$\mu\text{l g}^{-1}$ FG] | 217,8 | 212,2 |
| Stroma [$\mu\text{l g}^{-1}$ FG] | 83,9 | 85,9 |
| Zytosol [$\mu\text{l g}^{-1}$ FG] | 87,6 | 96,4 |

Tabelle 4.1 kann entnommen werden, dass die Vakuole in beiden Baumarten von den drei analysierten Fraktionen mit ca. 200 $\mu\text{l g}^{-1}$ FG das größte Volumen aufwies. Die Volumina von Zytosol und Stroma lagen mit durchschnittlich jeweils 90 $\mu\text{l g}^{-1}$ FG bei beiden Baumarten in einem ähnlichen Größenbereich.

Basierend auf den Daten aus Tabelle 4.1 wurden die Zuckerkonzentrationen in den subzellulären Kompartimenten der Mesophyllzellen berechnet.

Tabelle 4.2 Zuckerkonzentrationen in Vakuole, Stroma und Zytosol in hohen Bäumen von *F. sylvatica* und *Q. robur*

| | Gesamt-Zuckergehalt [$\mu\text{mol g}^{-1}$ FG] | Konzentration [mM] | | |
|----------------------|--|--------------------|---------------|------------------|
| | | Vakuole | Stroma | Zytosol |
| <i>F. sylvatica</i> | | | | |
| Glucose und Fructose | 49,8 \pm 2,6 | 232,2 \pm 14,8 | 5,5 \pm 9,6 | 0,0 \pm 0,0 |
| Saccharose | 28,7 \pm 2,4 | 78,8 \pm 15,0 | 2,4 \pm 4,1 | 122,1 \pm 20,1 |
| <i>Q. robur</i> | | | | |
| Glucose und Fructose | 19,9 \pm 2,9 | 93,4 \pm 14,4 | 1,0 \pm 1,8 | 0,3 \pm 0,6 |
| Saccharose | 42,3 \pm 3,8 | 89,3 \pm 43,3 | 6,9 \pm 8,0 | 236,3 \pm 80,1 |

Tabelle 4.2 kann entnommen werden, dass die Konzentrationen der Hexosen Glucose und Fructose in beiden Bäumen in der Vakuole am höchsten waren (232,2 \pm 14,8 mM in *F. sylvatica*, 93,4 \pm 14,4 mM in *Q. robur*). Von beiden Hexosen waren nur geringe Konzentrationen im Stroma der Chloroplasten und im Zytosol gemessen worden. Hingegen

waren die Konzentration an Saccharose sowohl in *F. sylvatica* ($122,1 \pm 20,1$ mM) als auch in *Q. robur* ($236,3 \pm 80,1$ mM) im Zytosol der Mesophyllzellen am höchsten, jedoch konnte Saccharose auch in nennenswerten Mengen in der Vakuole gemessen werden ($78,8 \pm 15,0$ mM in *F. sylvatica*, $89,3 \pm 43,3$ mM in *Q. robur*). Im Stroma der Chloroplasten befanden sich von allen gemessenen Zuckern nur sehr geringe Mengen.

Die folgende Abbildung zeigt den Vergleich der Saccharose-Konzentrationen aus dem Zytosol der Mesophyllzellen aus *F. sylvatica* und *Q. robur* mit der Saccharose-Konzentration des Phloemsaftes, welcher von kleinen Bäumen der beiden Arten von Fink *et al.* (2018) und Öner-Sieben und Lohaus (2014) gewonnen wurde.

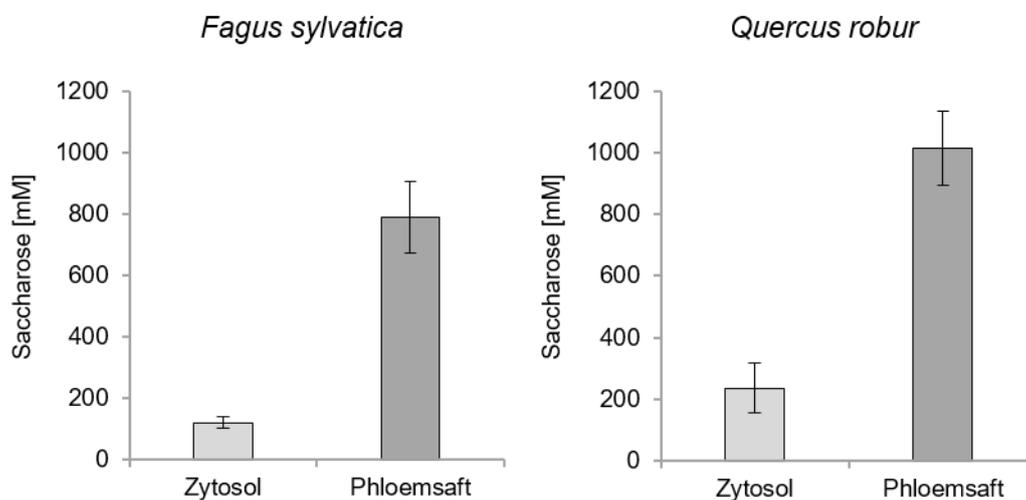


Abbildung 4.6 Vergleich der Saccharose-Konzentrationen im Zytosol von Mesophyllzellen und im Phloemsaft von *F. sylvatica* und *Q. robur* Es werden die Saccharose-Konzentrationen im Zytosol der Mesophyllzellen hoher Bäume der Arten *F. sylvatica* und *Q. robur* und im Phloemsaft kleiner Bäume der beiden Arten (Öner-Sieben und Lohaus 2014, Fink *et al.* 2018) gezeigt. Die Werte setzen sich jeweils aus den Mittelwerten von (n = 3) unabhängigen Messungen ± Standardabweichungen zusammen.

In Abbildung 4.6 ist zu erkennen, dass in beiden Baumarten hinsichtlich der Konzentration von Saccharose ein Gradient zwischen dem Zytosol der Mesophyllzellen und dem Phloemsaft vorherrscht. Die Saccharose-Konzentration des Phloemsaftes aus *F. sylvatica* (Fink *et al.*, 2018) war mit einer Konzentration von 789 mM ca. 6-mal höher als diejenige im Zytosol. In *Q. robur* ermittelten Öner-Sieben und Lohaus (2014) eine Saccharose-Konzentration von 1015 mM im Phloemsaft, welche 4-mal so hoch ist wie die Konzentration im Zytosol.

4.3 Neue Saccharose-Transporter aus *F. sylvatica* und phylogenetische Analyse von SUTs

4.3.1 Saccharose-Transporter

In der vorliegenden Arbeit wurde mit den beiden Laubbäumen *Quercus robur* und *Fagus sylvatica* sowie der Konifere *Picea abies* gearbeitet. In vorherigen Arbeiten konnte die vollständige cDNA der Transporter SUT1, SUT2 und SUT4 aus *Q. robur* sowie SUT1 und SUT2 aus *P. abies* isoliert werden (Öner-Sieben und Lohaus, 2014; Dobbstein *et al.*, 2019). Ebenfalls wurde von Dobbstein *et al.* (2019) die vollständige cDNA des SUT1 aus *F. sylvatica* gewonnen. Von den Transportern SUT2 und SUT4 konnten hingegen kurze Teilsequenzen aus *F. sylvatica* isoliert werden, mit welchen eine phylogenetische Analyse sowie die Überprüfung der Lokalisation und Funktionsüberprüfung nicht möglich waren. In dieser Arbeit ist es gelungen, die beiden Sequenzen zu vervollständigen. Die Sequenz vom SUT2 besteht aus 1851 Bp (617 AS), der SUT4 weist 1527 Bp (509 AS) auf. Die entsprechenden Nukleotid- und Aminosäuresequenzen befinden sich im Anhang. Die Benennung der beiden SUTs erfolgte nach der Nomenklatur von Peng *et al.* (2014) und richtete sich nach den Gruppen, in welchen die Transporter in der phylogenetischen Analyse clusterten (Abbildung 4.9).

Für beide Transporter wurde eine Transmembrandomänen-Vorhersage mit dem Webserver *DeepTMHMM* (Hallgren *et al.*, 2022) durchgeführt, wobei sich bei beiden SUTs die für Saccharose-Transporter typischen 12 Transmembrandomänen zeigten. Diese sind in zwei Blöcken aus jeweils 6 Domänen angeordnet, zwischen welchen sich ein zytoplasmatischer Loop befindet (Abbildung 4.7, Abbildung 4.8).

Eine strukturelle Besonderheit, welche die Saccharose-Transporter des Typs II aufweisen, ist ein deutlich längerer zytoplasmatischer Loop zwischen TMD 6 und 7 sowie der verlängerte N-Terminus. Diese zeigt sich auch beim SUT2 aus *F. sylvatica*.

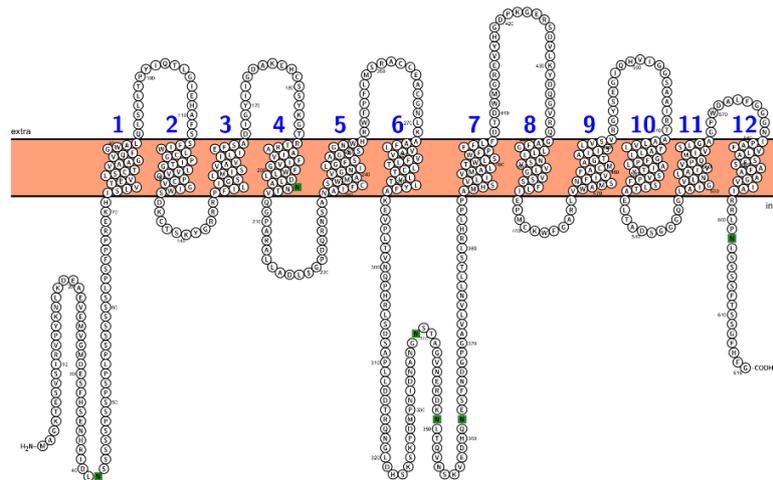


Abbildung 4.7 Visualisierung des SUT2 aus *F. sylvatica*. Die Abbildung wurde mit Protter (Version 1.0) erstellt (Omasits *et al.*, 2014). Die Transmembrandomänen sind mit den Nummern 1 bis 12 gekennzeichnet.

Die Visualisierung des FsSUT4 in Abbildung 4.8 zeigt im Vergleich zum FsSUT2 in Abbildung 4.7 einen deutlich kürzeren zytoplasmatischen Loop sowie einen kürzeren N-Terminus.

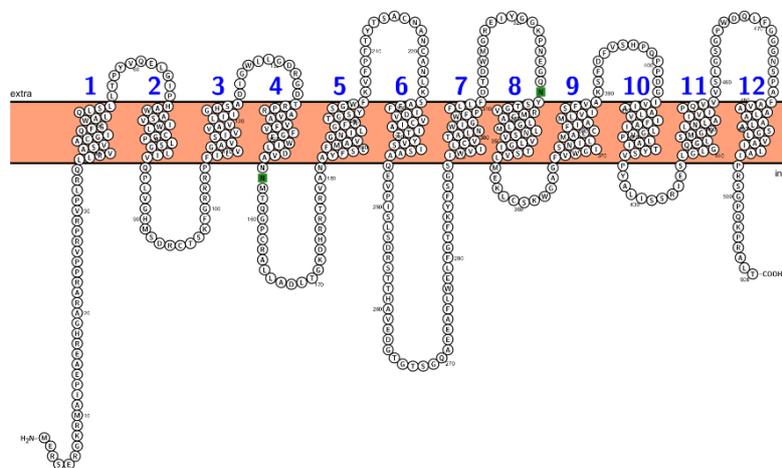


Abbildung 4.8 Visualisierung des SUT4 aus *F. sylvatica*. Die Abbildung wurde mit Protter (Version 1.0) erstellt (Omasits *et al.*, 2014). Die Transmembrandomänen sind mit den Nummern 1 bis 12 gekennzeichnet.

Mit den Sequenzen von FsSUT2 und FsSUT4 wurde eine phylogenetische Analyse durchgeführt, wobei für den Vergleich Saccharose-Transporter anderer Bäume ausgewählt wurden. Zudem wurden die Transporter, welche aus *Arabidopsis thaliana* sowie *Zea mays* isoliert wurden, in die Analyse mit einbezogen.

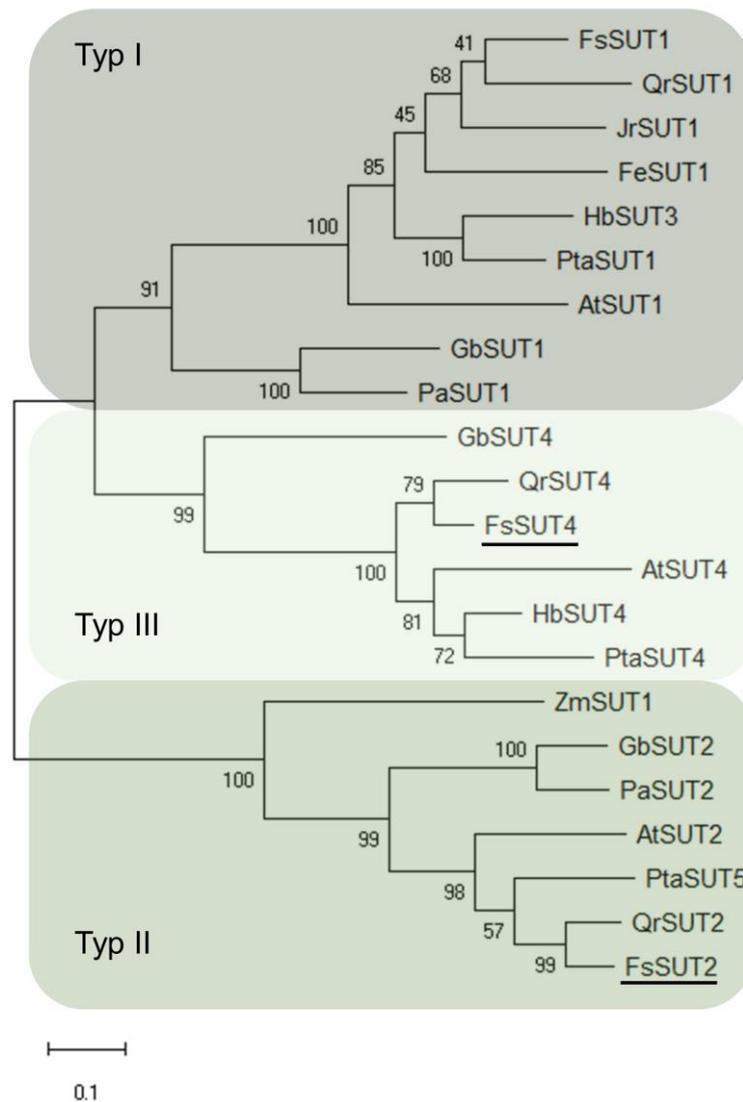


Abbildung 4.9 Phylogenetische Analyse von FsSUT2 und FsSUT4. Das Alignment der Aminosäuresequenzen wurde mit ClustalW durchgeführt. Der Stammbaum wurde mit der *Maximum-likelihood*-Methode mit 1000 Bootstrap-Wiederholungen gerechnet. Die in dieser Arbeit gewonnenen SUT-Sequenzen FsSUT2 und FsSUT4 sind unterstrichen. Für die phylogenetische Analyse wurden die Sequenzen folgender SUT verwendet: QrSUT1, QrSUT2, QrSUT4 (*Quercus robur*: AHB33871.1, MH281474.1, MH650991.1), FsSUT1, FsSUT2, FsSUT4: (*Fagus sylvatica*: MH650991.1, OP038564, OP038565), JrSUT1 (*Juglans regia*: AAU11810.1), FeSUT1 (*Fraxinus excelsior*: AHB33870.1), HbSUT3, HbSUT4 (*Hevea brasiliensis*: ABK60190.2, ABK60191.1), PtaSUT1, PtaSUT4, PtaSUT5 (*Populus tremula*×*alba*: ADW94615.1, ADW94617.1, ADW94618.1), AtSUT1, AtSUT2, AtSUT4 (*Arabidopsis thaliana*: AEE35247.1, AEC05635.1, NP_172467.1), GbSUT1, GbSUT2, GbSUT4 (*Ginkgo biloba*: MH650993.1, MH650994.1, MH650995.1), PaSUT1, PaSUT2 (*Picea abies*: MH281472, MH281473), ZmSUT1 (*Zea Mays*: NP_001292720.1)

Der SUT2 aus *F. sylvatica* clustert zusammen mit Saccharose-Transportern des Typs II, wohingegen der FsSUT4 in der Gruppe der Typ III-Transporter clustert. Ebenfalls ist zu erkennen, dass die nächste Verwandtschaft zu den Transportern der Typen II und III aus *Q. robur* besteht, welche auch zu den Fagaceae (Buchengewächsen) gehört.

4.3.2 SWEET12 aus *Q. robur* und phylogenetische Analyse von SWEETs

In die apoplastische Phloembeladung sind neben SUTs auch SWEETs involviert, welche die Saccharose aus den Mesophyllzellen in den Apoplasten bzw. die Zellwände transportieren (Chen *et al.*, 2012; Eom *et al.*, 2015). In dieser Arbeit ist es gelungen, die vollständige cDNA eines SWEETs aus *Q. robur* zu isolieren. Aufgrund der Clusterung in der darauffolgenden phylogenetischen Analyse (Abbildung 4.11) wurde der SWEET als QrSWEET12 bezeichnet.

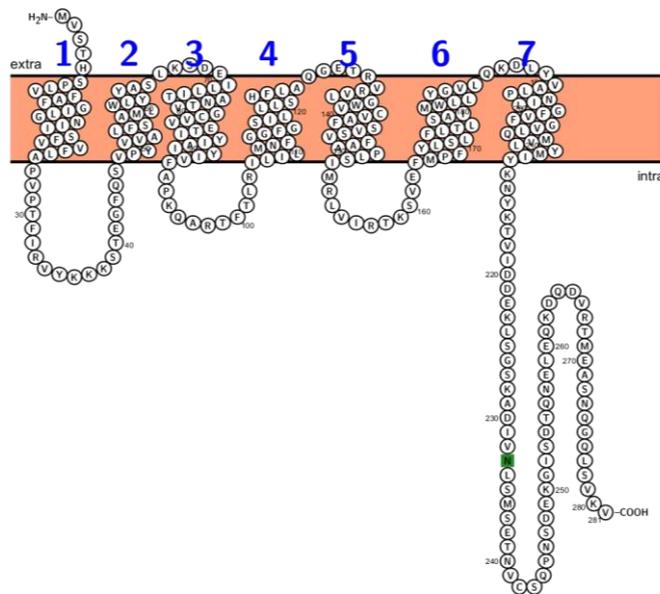


Abbildung 4.10 Visualisierung des QrSWEET12 Die Abbildung wurde mit Protter (Version 1.0) erstellt (Omasits *et al.*, 2014). Die Transmembrandomänen sind mit den Nummern 1 bis 7 gekennzeichnet.

Diese Bezeichnung entspricht der bereits vorhergesagten Benennung des SWEETs (Accession No.: XM_050401877) in der Nukleotid-Datenbank Blast® (Tabelle 3.40). Die isolierte Proteinsequenz besteht aus 281 Aminosäuren. Ebenso wie bei den Saccharose-Transportern (Abs. 4.1) wurde mit dieser Aminosäure-Sequenz zunächst eine Topologievorhersage mittels *DeepTMHMM* durchgeführt. Hierbei konnte gezeigt werden, dass der gefundene SWEET aus den für diesen Transportertyp typischen 7 TMD besteht.

Neben der vollständigen cDNA-Sequenz des QrSWEET12 konnte die Teilsequenz eines SWEETs bestehend aus 101 Aminosäuren aus Blattproben aus *Fagus sylvatica* isoliert werden. Dieser wurde aufgrund seiner Clusterung in der phylogenetischen Analyse als „FsSWEET12 EST“ bezeichnet. Der Stammbaum ausgewählter SWEETs ist in der folgenden Abbildung gezeigt. Für die Sequenzen aus *Arabidopsis thaliana*, *Juglans regia*, *Quercus robur* sowie *Populus trichocarpa*, welche mittels Blast® gefunden werden konnten, sind die entsprechenden Zugriffsnummern angegeben. Die Sequenzen für *Picea abies* wurden über die Genomdatenbank „congenie“ (Nystedt *et al.*, 2013) gefunden, entsprechende Sequenznummern sind hier ebenfalls in angegeben. Für *Fagus sylvatica* wurden die vorhergesagten SWEET Sequenzen über die Suchfunktion aus der Genomdatenbank für *F. sylvatica* nach Mishra *et al.* (2018) erhalten.

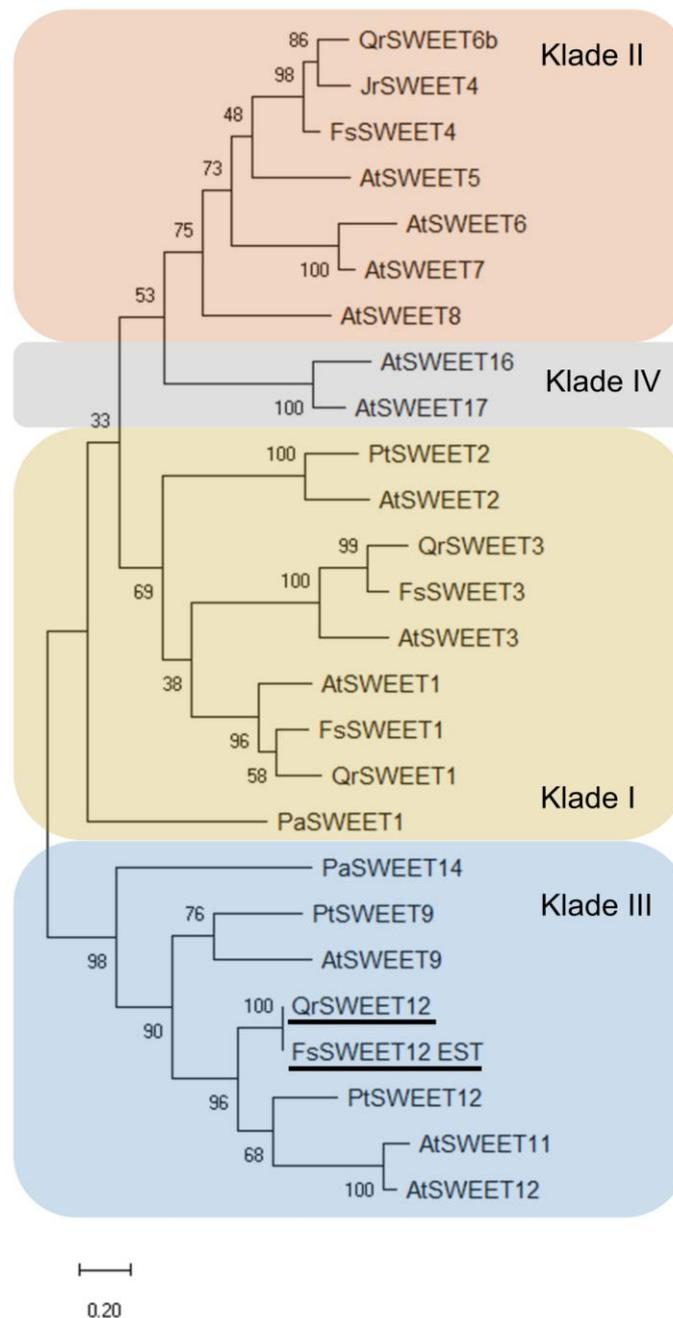


Abbildung 4.11 Phylogenetische Analyse ausgewählter SWEETs. Das Alignment der Aminosäuresequenzen wurde mit ClustalW durchgeführt. Der Stammbaum wurde mit der *Maximum-likelihood*-Methode mit 1000 Bootstrap-Wiederholungen gerechnet. Die in dieser Arbeit erhaltenen SWEET-Sequenzen des putativen QrSWEET12 und FsSWEET12_EST sind unterstrichen. Für die phylogenetische Analyse wurden die Sequenzen folgender SWEETs verwendet: AtSWEET1, AtSWEET2, AtSWEET3, AtSWEET5, AtSWEET6, AtSWEET7, AtSWEET8, AtSWEET9, AtSWEET11, AtSWEET12, AtSWEET16, AtSWEET17 (*Arabidopsis thaliana*: NM_101997, NM_112338, Q6NQN5, Q9FM10, NP_176849, Q8LBF7, Q8LFH5, Q9ZV02, Q9SMM5, NP_197755, NP_001319571, Q84WN3); FsSWEET3, FsSWEET4 (*Fagus sylvatica*); JrSWEET4 (*Juglans regia*: XP_018828829); PaSWEET1, PaSWEET14 (*Picea abies*: MA_10429987g0020, MA_107522g0010) PtSWEET2, PtSWEET9, PtSWEET12 (*Populus trichocarpa*: XP_006377713, XM_024590906.1, XM_002322246.4) QrSWEET1, QrSWEET3, QrSWEET6b (*Quercus robur*: XM_050398512, XM_050397660.1, XP_050271275)

In der phylogenetischen Analyse zeigte sich, dass beide SWEET12-Sequenzen aus *F. sylvatica* und *Q. robur* in der Klade III eine eigene Subgruppe bilden. Die nächste Subgruppe bildet der SWEET12 aus *Populus trichocarpa* (dt. Westliche Balsam-Pappel).

4.4 Expression, Charakterisierung und Lokalisation von Saccharose-Transportern

4.4.1 Expression von Saccharose-Transportern in kleinen und hohen *F. sylvatica* und *Q. robur*

Die Expression der Saccharose-Transporter SUT1, SUT2 und SUT4 aus *F. sylvatica* und *Q. robur* wurde in den Organen Blatt, Rinde und Holz sowohl bei kleinen als auch bei hohen Bäumen gemessen, um einen möglichen Effekt der Wachstumshöhe bzw. des Alters der Bäume auf die Expression der Transporter zu untersuchen.

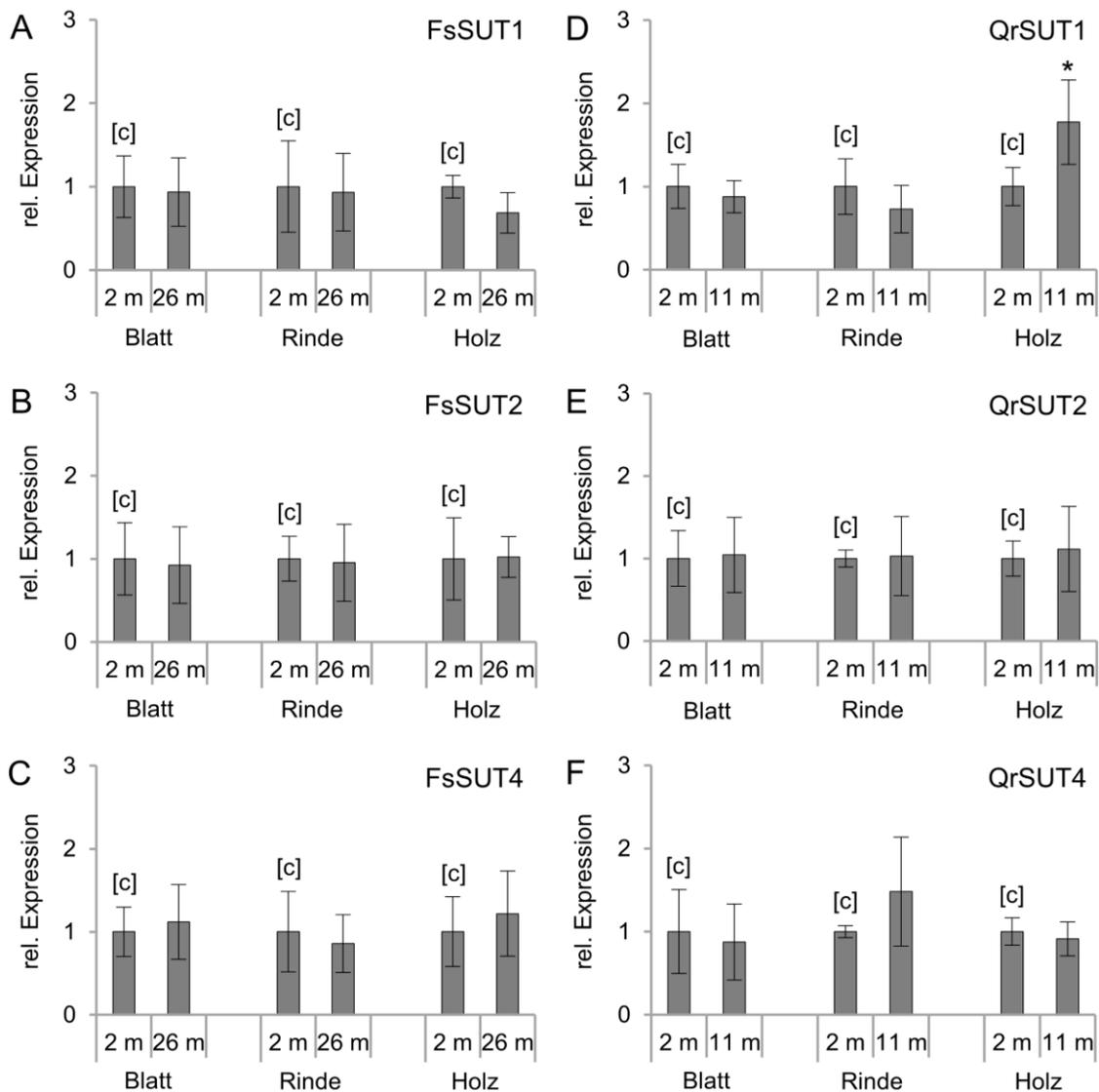


Abbildung 4.12 Expression von Saccharose-Transportern in kleinen im Vergleich zu hohen Bäumen von *F. sylvatica* und *Q. robur*. A, B, C: Relative Expression von SUT1, SUT2 und SUT4 in *F. sylvatica*. D, E, F: Relative Expression von SUT1, SUT2 und SUT4 in *Q. robur*. Die Proben der kleinen Bäume (2 m Höhe) wurden für die jeweiligen Organe als Kalibrator [c] gesetzt. Signifikante Änderungen zwischen dem Kalibrator [c] und den Proben der hohen Bäume (26 m bzw. 11 m Höhe) wurden mit einem gepaarten t-Test untersucht und sind mit Sternchen gekennzeichnet ($p \leq 0,05 = *$; $p \leq 0,01 = **$; $p \leq 0,001 = ***$), $n = 6$.

In Abbildung 4.12 wird deutlich, dass die Expression der drei gemessenen SUTs in *F. sylvatica* und *Q. robur* nicht von der Wachstumshöhe bzw. dem Alter der Bäume beeinflusst wird. Die einzige signifikante Änderung zeigte sich in der Expression des SUT1 im Holz von *Q. robur*, welche dort in hohen Bäumen (11 m) signifikant höher war als in kleinen Bäumen (2 m, $p < 0,05$).

4.4.2 Organspezifische Expression von Saccharose-Transportern in *F. sylvatica* und *Q. robur*

Neben dem Einfluss der Wachstumshöhe auf die SUT-Expression wurden auch organspezifische Unterschiede in der Expression der SUT in *F. sylvatica* und *Q. robur* untersucht. Hierbei wurde eine Analyse der SUT-Expression in Blättern im Vergleich zur Expression in Rinde und Holz durchgeführt. Dabei wurden jeweils die Proben von kleinen Bäumen miteinander verglichen sowie ebenso Proben der hohen Bäume. Neben Blatt-, Rinden- und Holzproben wurden von hohen Bäumen von *F. sylvatica* Proben von weiblichen Blüten in die vergleichende Analyse der SUT-Expression mit einbezogen. Die Ergebnisse sind in folgender Abbildung gezeigt.

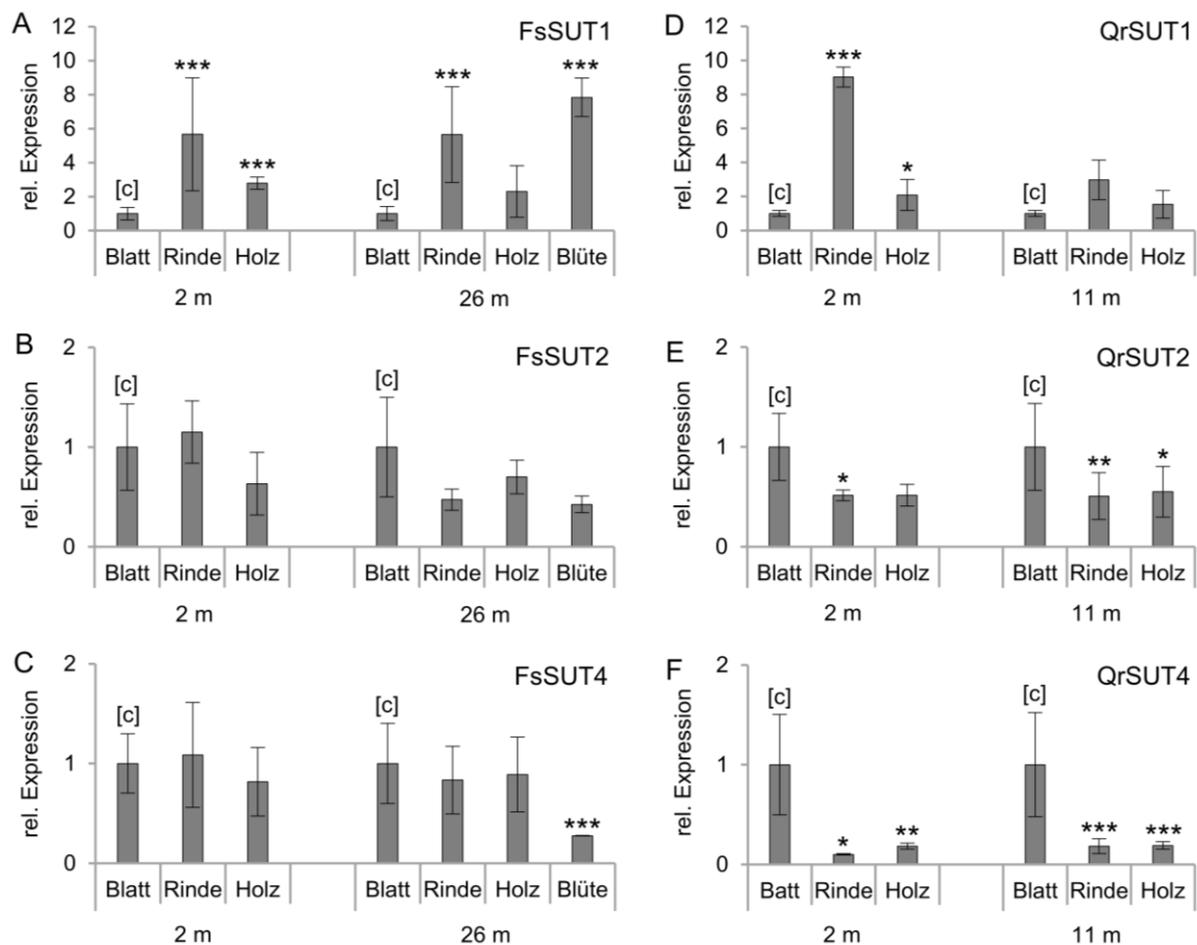


Abbildung 4.13 Vergleichende organspezifische Expression von Saccharose-Transportern in *F. sylvatica* und *Q. robur*. **A, B, C:** Relative Expression von SUT1, SUT2 und SUT4 in Blättern im Vergleich zu Rinde, Holz und Blüte (26 m Höhe) in *F. sylvatica*. **D, E, F:** Relative Expression von SUT1, SUT2 und SUT4 in Blättern im Vergleich zu Rinde und Holz in *Q. robur*. Die Proben der Blätter wurden sowohl für die Proben der kleinen Bäume als auch für die Proben der hohen Bäume als Kalibrator [c] gesetzt. Signifikante Änderungen zwischen dem Kalibrator [c] und den Vergleichsproben wurden mit einem gepaarten t-Test untersucht und sind mit Sternchen gekennzeichnet ($p \leq 0,05 = *$; $p \leq 0,01 = **$; $p \leq 0,001 = ***$), $n = 6$.

In Abbildung 4.13 A, B und C zeigt sich, dass die Expression von SUT1, SUT2 und SUT4 im organspezifischen Vergleich in kleinen sowie in hohen Bäumen einen ähnlichen Verlauf aufwies. In beiden Wachstumshöhen zeigten sich bei den Organen Blatt, Rinde und Holz einzig beim FsSUT1 signifikante Unterschiede. Hierbei war jeweils die Expression des SUT1 in der Rinde signifikant höher als im Kalibrator Blatt ($p < 0,001$). In kleinen Bäumen war zudem die Expression in Holz im Vergleich zu der Expression in Blättern signifikant erhöht ($p < 0,001$). Die Transporter SUT2 und SUT4 zeigten in *F. sylvatica* in den Organen Blatt, Rinde und Holz ähnliche Expressionsniveaus ohne signifikante Änderungen. Die Expression des FsSUT1 war in der weiblichen Blüte im Vergleich zu den Blattproben signifikant erhöht

($p < 0,001$), wohingegen die Expression des FsSUT4 in Blüten auf einem signifikant erniedrigten Niveau lag ($p < 0,001$).

In *Q. robur* (Abbildung 4.13 D, E, F) zeigte der QrSUT1 in den Proben der hohen Bäume ein ähnliches Expressionsniveau ohne signifikante Änderungen. In den Proben der kleinen Bäume war die Expression des SUT1 in Rinde und Holz im Vergleich zum Kalibrator Blatt signifikant erhöht ($p < 0,001$ für Rinde bzw. 0,05 für Holz). Die Expression des SUT2 war in Rinde sowohl bei kleinen und hohen Bäumen signifikant niedriger im Vergleich zu den Blattproben ($p < 0,05$ bzw. 0,01). Bei den Proben der hohen Bäume zeigte sich auch eine signifikant niedrigere Expression in den Holzproben ($p < 0,05$). Der Transporter QrSUT4 zeigte in Blättern sowohl bei kleinen als auch bei hohen Bäumen eine signifikant höhere Expression verglichen zu jener in Rinde und Holz.

4.4.3 Charakterisierung von SUTs und Saccharose-Aufnahme in *S. cerevisiae*

Für die Untersuchung der Funktionalität der SUT-Sequenzen aus *F. sylvatica* (FsSUT1, FsSUT2, FsSUT4) und *Q. robur* (QrSUT2, QrSUT4) wurde die cDNA der Transporter in *S. cerevisiae* exprimiert. Hierbei wurde die Aufnahmefähigkeit der SUTs von Saccharose untersucht und anschließend entsprechende enzymkinetische Parameter ermittelt. Für alle untersuchten Transporter konnte gezeigt werden, dass Hefezellen, welche mit dem *sense*-Konstrukt der SUTs transformiert wurden, ^{14}C -markierte Saccharose aufnehmen konnten. Hingegen zeigten sich bei den Negativkontrollen, bei welchen die Transformation mit den entsprechenden *antisense*-Konstrukten der SUTs erfolgte, keine oder nur eine sehr geringe Aufnahmerate von Saccharose. Diese Versuche bestätigten somit, dass die untersuchten Sequenzen für funktionale SUT-Proteine codieren. In Tabelle 4.3 sind die Ergebnisse der Hefeexpression zusammengefasst. Die Sequenzen von FsSUT1, QrSUT2 und QrSUT4 sind von Dobbstein *et al.* (2019) publiziert worden, die Untersuchung der Funktionalität sowie die Bestimmung der K_m -Werte erfolgte in der vorliegenden Arbeit. Die Sequenz von QrSUT1 sowie die Überprüfung der Funktionalität und Bestimmung des K_m -Wertes erfolgte von Öner-Sieben (2014). Die Ergebnisse wurden der Vollständigkeit halber in die Tabelle mit aufgenommen.

Tabelle 4.3 Funktionsüberprüfung der SUTs in *F. sylvatica* und *Q. robur*

| Name | Aminosäuren | NCBI Accession Nr. | Funktionalität in Hefezellen | K _m -Wert für Saccharose (mM) |
|---------------------|-------------|--------------------|------------------------------|--|
| <i>F. sylvatica</i> | | | | |
| SUT1* | 505 | MH650992 | Ja | 2,3 |
| SUT2 | 616 | OP038564 | Ja | 2,7 |
| SUT4 | 508 | OP038565 | Ja | 1,6 |
| <i>Q. robur</i> | | | | |
| SUT1** | 500 | KF736982 | Ja | 6,7** |
| SUT2* | 604 | MH281474 | Ja | 2,5 |
| SUT4* | 513 | MH650991 | Ja | 6,5 |

*Sequenzen stammen aus Dobbelstein *et al.* (2019); **Sequenz stammt aus Öner-Sieben und Lohaus (2014) und enzymkinetische Parameter wurden von Öner-Sieben (2014) ermittelt

4.4.4 Expression von Saccharose-Transportern in kleinen und hohen *P. abies*

Die Expression der Saccharose-Transporter SUT1 und SUT2 wurde in *P. abies* ebenfalls in kleinen und hohen Bäumen untersucht.

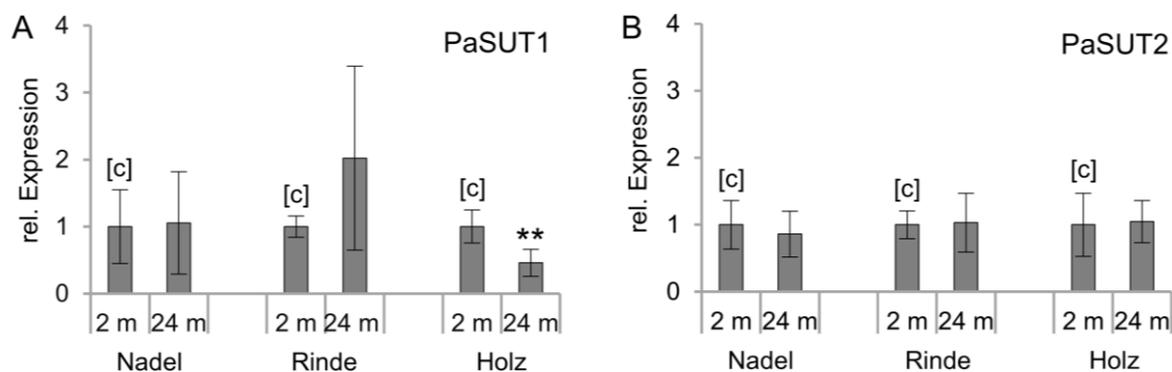


Abbildung 4.14 Expression von Saccharose-Transportern in kleinen und hohen *P. abies*. Relative Expression von SUT1 (A) und SUT2 (B) in *P. abies*. Die Proben der kleinen Bäume (2 m Höhe) wurden für die jeweiligen Organe als Kalibrator [c] gesetzt. Signifikante Änderungen zwischen dem Kalibrator [c] und den Proben der hohen Bäume (24 m Höhe) wurden mit einem gepaarten t-Test untersucht und sind mit Sternchen gekennzeichnet ($p \leq 0,05 = *$; $p \leq 0,01 = **$; $p \leq 0,001 = ***$), $n = 6$.

In Abbildung 4.14 wird deutlich, dass sich die Expression von SUT1 und SUT2 in den Proben kleiner Bäume (2 m) größtenteils nicht auf einem signifikanten Niveau von der Expression in hohen Bäumen (24 m) unterschieden. Die einzige Ausnahme zeigte sich in der Expression des SUT1 in Holz, welche in den Proben hoher Bäume signifikant niedriger lag als in den Proben kleiner Bäume ($p = 0,01$).

4.4.5 Organspezifische Expression von Saccharose-Transportern in *P. abies*

Ebenso wie bei *F. sylvatica* und *Q. robur* wurde die organspezifische Expression der Saccharose-Transporter PaSUT1 und PaSUT2 in *P. abies* untersucht. Dabei wurde die Expression der SUT in zweijährigen Nadeln als Kalibrator gesetzt. Die Ergebnisse sind in der folgenden Abbildung gezeigt.

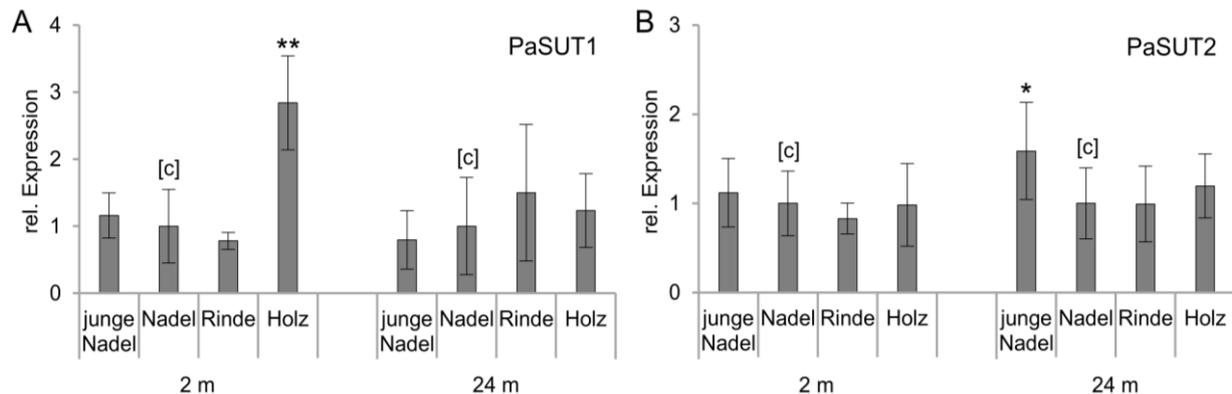


Abbildung 4.15 Vergleichende gewebespezifische Expression von Saccharose-Transportern in *P. abies*. Relative Expression von SUT1 (A) und SUT2 (B) in Nadeln (zweijährig) im Vergleich zu jungen (einjährigen) Nadeln, Rinde und Holz in *P. abies*. Die Proben der zweijährigen Nadeln wurden sowohl für die Proben der kleinen Bäume (2 m) als auch für die hohen Bäume (24 m) als Kalibrator [c] gesetzt. Signifikante Änderungen zwischen dem Kalibrator [c] und den Vergleichsproben wurden mit einem gepaarten t-Test untersucht und sind mit Sternchen gekennzeichnet ($p \leq 0,05 = *$; $p \leq 0,01 = **$; $p \leq 0,001 = ***$), $n = 6$.

In Abbildung 4.15 A ist zu erkennen, dass die Expression des PaSUT1 sowohl in kleinen als auch in hohen Bäumen in allen Organen auf einem ähnlichen Niveau lagen. Der einzige signifikante Unterschied im Vergleich zum Kalibrator zeigte sich in der erhöhten Expression des SUT1 im Holz von kleinen Bäumen ($p < 0,01$). Der Transporter PaSUT2 wurde ebenfalls größtenteils in allen untersuchten Organen gleich stark exprimiert. Einzig in den jungen, einjährigen Nadeln von hohen Bäumen zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Expression im Vergleich zu zweijährigen Nadeln ($p < 0,05$).

4.5 Zellspezifische Expression von Saccharose-Transportern

Die Lokalisation der Saccharose-Transporter kann Hinweise über ihre Funktion im pflanzlichen Organismus geben. Aus diesem Grund wurde die RNA-*in-situ*-Hybridisierung durchgeführt, bei welcher die mRNA der SUTs im Gewebe lokalisiert wird. Die Hybridisierung wurde jeweils mit einer *antisense*-Sonde sowie mit einer *sense*-Sonde als Negativkontrolle für die jeweiligen SUTs durchgeführt. Bei der erfolgreichen Hybridisierung der DIG-markierten RNA-Sonde in *antisense*-Orientierung zeigt sich aufgrund der Reaktion der am Antikörper gebundenen

alkalischen Phosphatase mit BCIP und NBT eine Blaufärbung der Zellen. Dies deutet auf eine erhöhte Expression der SUTs in den entsprechenden Geweben hin. In den mit der *sense*-Sonde bearbeiteten Gewebeschnitten sollte sich keine oder eine wesentlich weniger intensive Färbung zeigen als bei Schnitten, bei welchen die Hybridisierung mit der *antisense*-Sonde durchgeführt wurde.

4.5.1 *Fagus sylvatica*

Für die Lokalisation der Saccharose-Transporter in *F. sylvatica* wurden der FsSUT1 sowie FsSUT2 ausgewählt, da die Transporter des Typs I bzw. II mit der Phloembeladung in Verbindung stehen. Die Hybridisierung wurde mit Gewebeschnitten von Blättern, jungen Zweigen sowie weiblichen Blüten durchgeführt. Bei Blüten handelt es sich um *sink*-Gewebe, welches von der Versorgung mit Assimilaten aus den Blättern angewiesen ist. Bei den gewebespezifischen Expressionsuntersuchungen (Abschnitt 4.4.2) zeigte sich in weiblichen Blüten hoher Bäume eine erhöhte Expression des FsSUT1 im Vergleich zu Blättern. Aus diesem Grund wurde die Lokalisation des SUT1 auch in Blüten durchgeführt, um eine mögliche Rolle der SUTs nicht nur in der Phloembeladung sondern auch in der Entladung von Saccharose aus dem Phloem zu untersuchen.

4.5.1.1 Expression des FsSUT1 und FsSUT2 im Blatt

Für die Lokalisation des FsSUT1 sowie des FsSUT2 wurden Blattquerschnitte junger Blätter verwendet, wobei insbesondere die Leitbündel der kleinsten Blattvenen, der sog. *minor veins*, betrachtet wurden.

Abbildung 4.16 zeigt die erfolgreiche *in-situ*-Hybridisierung für beide Transporter im Blattquerschnitt. Das blau-violette Signal zeigte sich beim FsSUT1 in den Zellen des Phloems und beim FsSUT2 über den gesamten Blattquerschnitt verteilt. Insbesondere und am intensivsten waren beim FsSUT2 die Zellen des Phloems sowie des Palisadenparenchyms gefärbt.

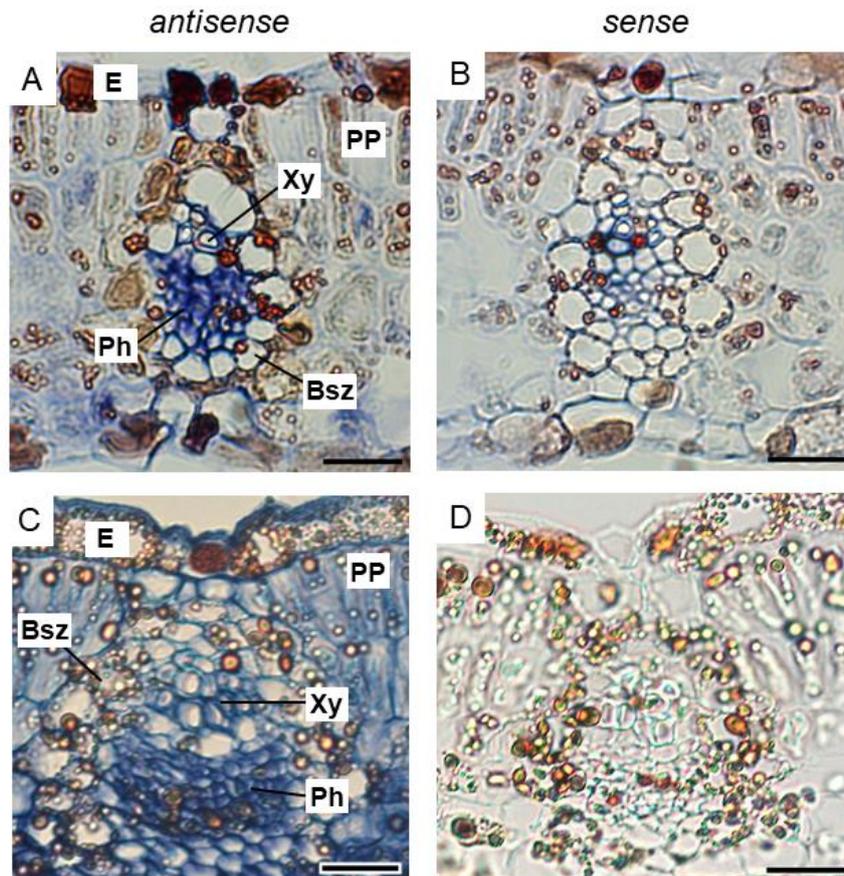


Abbildung 4.16 Zellspezifische Expression des FsSUT1 und des FsSUT2 im Querschnitt des Blattes. **A:** Gewebeschnitt des Blattes, welcher mit der *antisense*-Sonde des FsSUT1 hybridisiert wurde. Die blau-violette Färbung für Expression des FsSUT1 ist in den Zellen des Phloems (**Ph**) zu erkennen. **C:** Gewebeschnitt des Blattes, welcher mit der *antisense*-Sonde des FsSUT2 hybridisiert wurde. Die Färbung ist im gesamten Blattquerschnitt verteilt. Insbesondere sind das Palisadenparenchym (**PP**) sowie das Phloem (**Ph**) gefärbt. Die Bündelscheidenzellen (**Bsz**), das Xylem (**Xy**) und die Epidermis (**E**) zeigen keine Färbung. **B, D:** Gewebeschnitte zur Negativkontrolle, welche mit der *sense*-Sonde hybridisiert wurden. Maßstabsbalken entsprechen einer Länge von 50 μm .

4.5.1.2 Expression des FsSUT1 und des FsSUT2 in der Sprossachse

In der einjährigen Sprossachse von *F. sylvatica* konnte die mRNA des FsSUT1 in den Zellen des Phloems nachgewiesen werden.

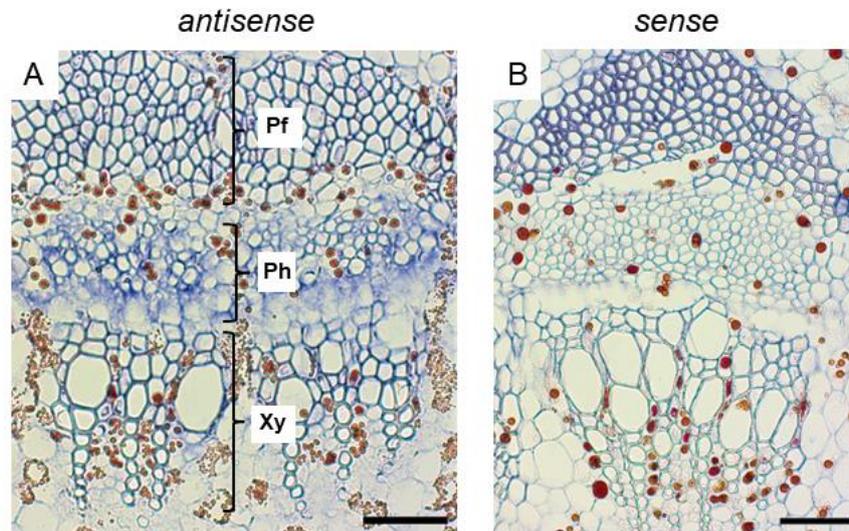


Abbildung 4.17 Zellspezifische Expression des FsSUT1 im Querschnitt der einjährigen Sprossachse. **A:** Gewebeschnitt, der mit der *antisense*-Sonde hybridisiert wurde. Eine erhöhte Expression des SUT1 zeigt sich in den Zellen des Phloems (**Ph**) durch die blau-violette Färbung der Zellen. Die Zellen des Xylems (**Xy**) und der Phloemfasern (**Pf**) zeigen keine Färbung **B:** Gewebeschnitt, der mit der *sense*-Sonde des FsSUT1 hybridisiert wurde. Es ist keine Färbung der Zellen zu erkennen. Maßstabsbalken entsprechen einer Länge von 50 µm.

Die mRNA des FsSUT2 konnte in der zweijährigen Sprossachse von *F. sylvatica* ebenfalls in den Zellen des Phloems nachgewiesen werden.

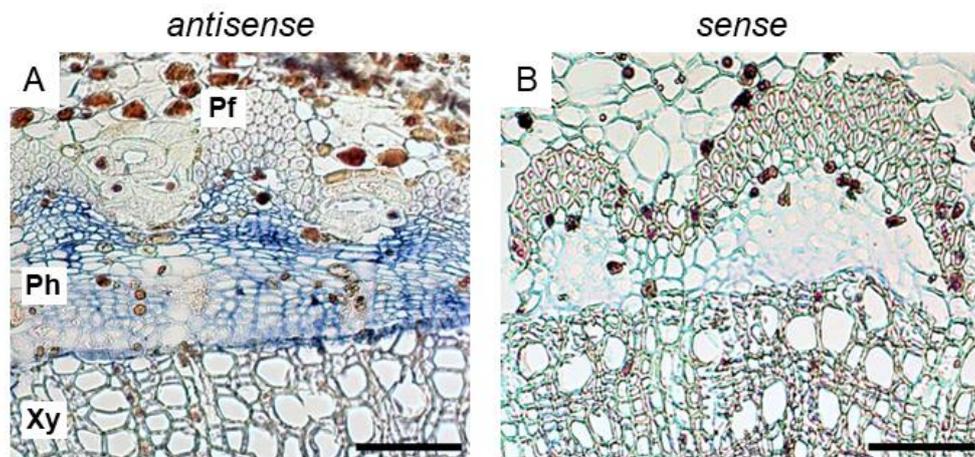


Abbildung 4.18 Zellspezifische Expression des FsSUT2 im Spross. **A:** Gewebeschnitt, welcher mit der *antisense*-Sonde hybridisiert wurde. Das blau-violette Signal für die Expression des FsSUT2 ist im Phloem (**Ph**) zu erkennen. Im Xylem (**Xy**) sowie in den Phloemfasern (**Pf**) zeigt sich kein Signal. **B:** Der mit der *sense*-Sonde hybridisierte Gewebeschnitt zur Negativkontrolle. Maßstabsbalken entsprechen einer Länge von 50 μm .

4.5.1.3 Expression des FsSUT1 in der weiblichen Blüte

Die Untersuchung der Lokalisation des FsSUT1 in den weiblichen Blüten wurden anhand von Querschnitten derselben durchgeführt.

Abbildung 4.19 A und B zeigen jeweils nur ein Fruchtblatt, welches eine Samenanlage enthält. In Abb. 4.19 C und D ist das gesamte Gynözeum gezeigt, das aus drei Fruchtblättern besteht, in welchen sich jeweils eine bis zwei Samenanlagen befinden. In den mit der *antisense*-Sonde hybridisierten Gewebeschnitten konnte die mRNA des FsSUT1 in den Samenanlagen nachgewiesen werden (Abbildung 4.19 A und C). Hingegen war bei der Negativkontrolle, bei welcher die Hybridisierung mit der entsprechenden *sense*-Sonde erfolgte (Abbildung 4.19 B und D), keine Färbung der Gewebeschnitte zu erkennen.

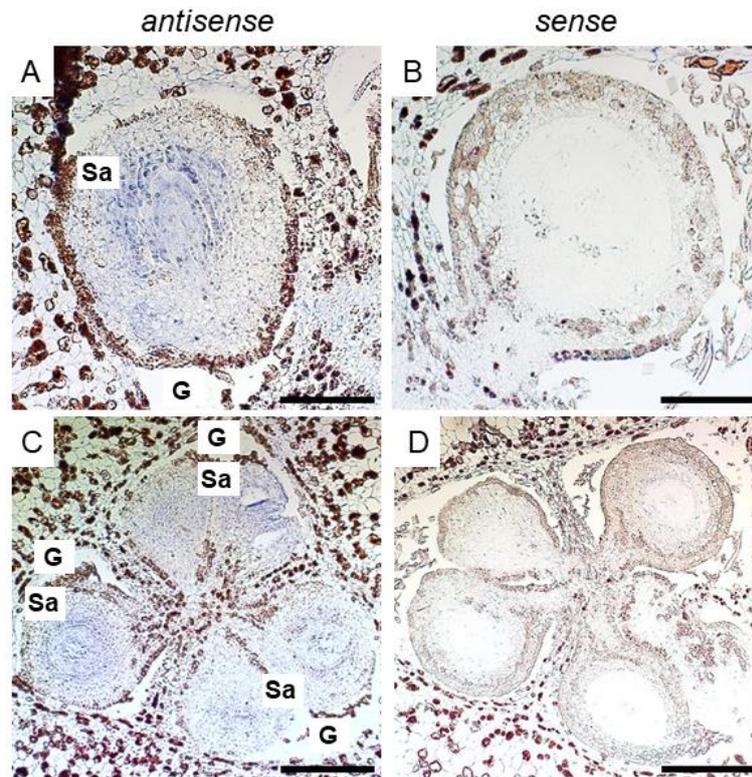


Abbildung 4.19 Zellspezifische Expression des FsSUT1 im Querschnitt des Fruchtknotens der weiblichen Blüte. A und C zeigen die mit der *antisense*-Sonde hybridisierten Gewebeschnitte und blau-violettes Signal für die Expression des FsSUT1 in den Zellen der Samenanlagen (Sa), welche in die Fruchtblätter (G) eingeschlossen sind. B und D zeigen die mit der *sense*-Sonde hybridisierten Schnitte der Negativkontrolle. A, B: Maßstabsbalken entsprechen einer Länge von 50 µm, C, D: Maßstabsbalken entsprechen einer Länge von 100 µm.

4.5.2 *Picea abies*

In *Picea abies* wurde die Lokalisation der SUT1 und SUT2 in *sink*-Nadeln, zweijährigen Nadeln sowie einjährigen Sprossachsen durchgeführt. Hierbei konnte der PaSUT2 in allen genannten Organen lokalisiert werden. Die Lokalisation der mRNA des PaSUT1 ist in zweijährigen Nadeln und im einjährigen Spross gelungen. Die Ergebnisse werden im Folgenden aufgeführt.

4.5.2.1 Expression des PaSUT1 und PaSUT2 in *sink*-Nadeln und zweijährigen Nadeln

In Abbildung 4.20 ist die *in-situ*-Hybridisierung der Saccharose-Transporter SUT1 und SUT2 aus *P. abies* in zweijährigen Nadeln gezeigt. Die mRNA des SUT1 konnte in beiden Leitbündeln der Nadel im Phloem lokalisiert werden (Abbildung 4.20 A), wobei die mRNA des SUT2 sowohl im Phloem als auch in Zellen des Transfusionsparenchyms detektiert werden konnte (Abbildung 4.20 C). In den mit der *sense*-Sonde hybridisierten Nadeln zur Negativkontrolle war keine Färbung der Zellen zu erkennen (Abbildung 4.20 B und D).

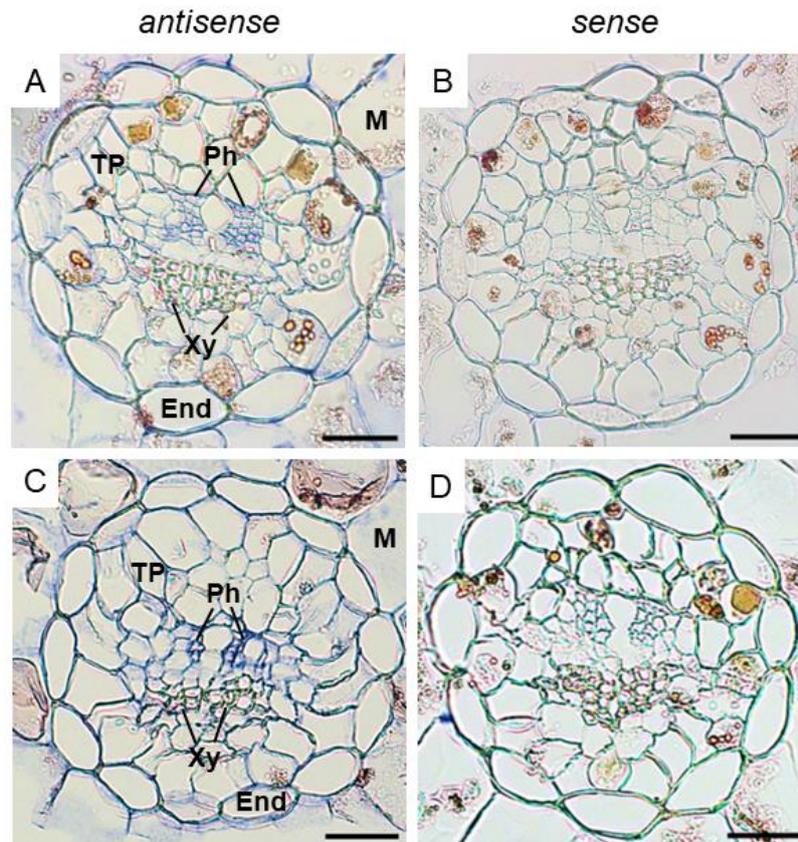


Abbildung 4.20 Zellspezifische Expression des PaSUT1 und PaSUT2 in Querschnitten von zweijährigen Nadeln. **A:** Die mit der PaSUT1 *antisense*-Sonde hybridisierten Gewebeschnitte zeigen ein blau-violettes Signal für die Expression des PaSUT1 im Phloem (**Ph**). Im Xylem (**Xy**), Transfusionsparenchym (**TP**) und der Endodermis (**End**) ist keine Färbung zu erkennen. **B:** Die mit der *sense*-Sonde des PaSUT1 hybridisierten Schnitte zur Negativkontrolle. **C:** Die mit der PaSUT2 *antisense*-Sonde hybridisierten Schnitte zeigen im Phloem sowie in einzelnen Zellen des Transfusionsparenchyms blau-violettes Signal für die erhöhte Expression in diesen Bereichen. **D:** Die mit der PaSUT2 *sense*-Sonde hybridisierten Schnitten für die Negativkontrolle. Maßstabsbalken entsprechen einer Länge von 50 μm .

In *sink*-Nadeln ist es gelungen, die mRNA des PaSUT2 im Zentralzylinder zu lokalisieren (Abbildung 4.21). Im Gegensatz zu den zweijährigen Nadeln können im Zentralzylinder die Zellen des Phloems und Xylems noch nicht definiert werden, da sich die *sink*-Nadeln noch im Entwicklungsstadium befinden. Die blau-violette Färbung für ein positives Signal war im gesamten Zentralzylinder vorhanden (Abbildung 4.21 A).

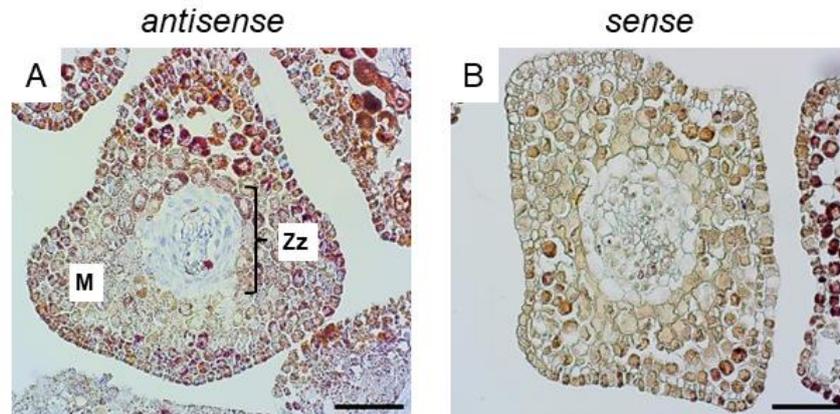


Abbildung 4.21 Zellspezifische Expression des PaSUT2 im Querschnitt von *sink*-Nadeln. **A:** Gewebeschnitt, welcher mit der *antisense*-Sonde des PaSUT2 hybridisiert wurde. Die blau-violette Färbung für eine erhöhte Expression des PaSUT2 ist im Zentralzylinder (**Zz**) zu erkennen. In den Mesophyllzellen (**M**) zeigt sich keine Färbung. **B:** Gewebeschnitt, der mit der *sense*-Sonde hybridisiert wurde. Es ist keine Färbung von Zellen zu erkennen. Maßstabsbalken entsprechen einer Länge von 50 μm .

4.5.2.2 Expression von SUT aus *P. abies* im einjährigen Spross

Die *in-situ*-Hybridisierung in einjährigen Sprossachsen ist sowohl für den PaSUT1 als auch für den PaSUT2 gelungen (Abbildung 4.22). Bei beiden Transportern konnte die mRNA in mehreren Gewebetypen nachgewiesen werden. Beide Transporter konnten im Rindenparenchym und im Phloem lokalisiert werden. Bei beiden Saccharose-Transportern zeigte die Negativkontrolle, welche mit den entsprechenden *sense*-Sonden durchgeführt wurde, keine Färbung bzw. kein Signal (Abbildung 4.22 B und D).

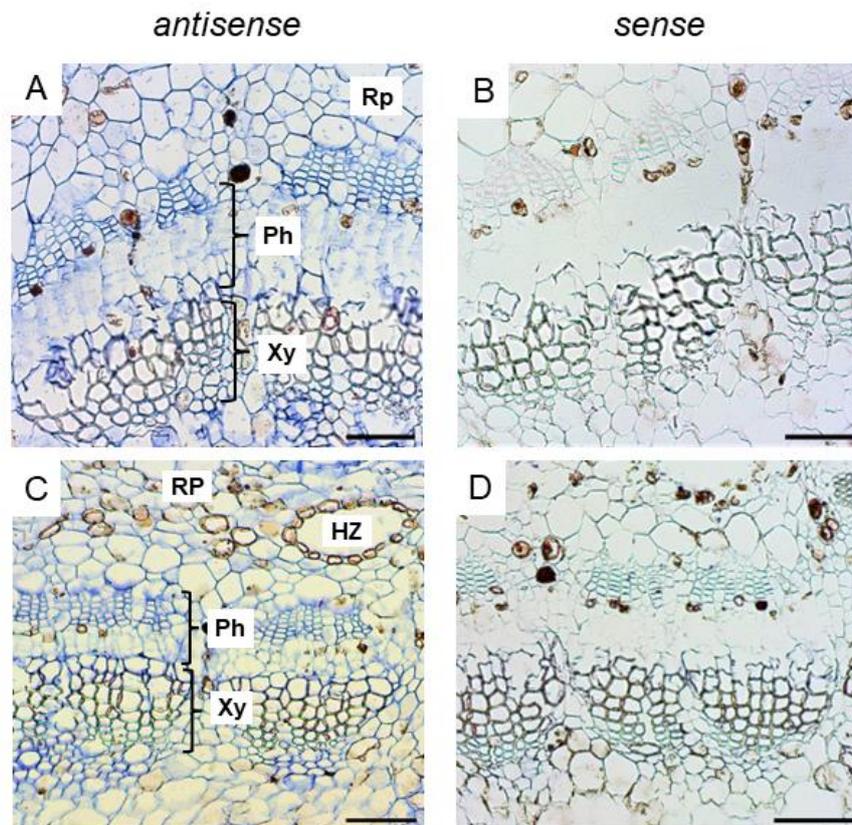


Abbildung 4.22 Zellspezifische Expression des PaSUT1 und PaSUT2 im Querschnitt der einjährigen Sprossachse. **A:** Im mit der PaSUT1 *antisense*-Sonde hybridisierten Gewebeschnitt zeigt sich besonders im Phloem (**Ph**) eine erhöhte Expression des PaSUT1. Auch einzelne Zellen des Rindenparenchyms (**Rp**) sind gefärbt. Die Zellen des Xylems (**Xy**) zeigen kein Signal. **B:** Der mit der PaSUT1 *sense*-Sonde hybridisierte Gewebeschnitt für die Negativkontrolle. **C:** Der mit der PaSUT2 *antisense*-Sonde hybridisierte Querschnitt zeigt insbesondere in den Zellen des Phloems blau-violettes Signal für die erhöhte Expression in diesen Bereichen. Ebenfalls sind einzelne Zellen des Rindenparenchyms gefärbt. **D:** Negativkontrolle mit der PaSUT2 *sense*-Sonde. (**HZ**) = Harzkanal. Maßstabsbalken entsprechen einer Länge von 50 µm.

4.6 Intrazelluläre Lokalisation

Mit den SUTs aus *F. sylvatica* und *Q. robur* sollte die Untersuchung ihrer intrazellulären Lokalisation in Protoplasten aus *A. thaliana* durchgeführt werden (Abs. 3.8). Auch nach mehrmaliger Wiederholung der Transformation der Protoplasten ist die intrazelluläre Lokalisation bei keinem der untersuchten SUTs gelungen. Lediglich die bei der Transformation durchgeführte Positivkontrolle mit den leeren GFP-Plasmiden (pSS87 bzw. pCS120), welche keine SUT-Sequenzen enthielten, war erfolgreich (Ergebnisse nicht gezeigt). Die Protoplasten zeigten sich dabei unter dem Fluoreszenzmikroskop gänzlich grün gefärbt.

5. Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Mechanismus der Phloembeladung in europäischen Baumarten zu analysieren. Für die Untersuchungen wurden die beiden Laubbaumarten *Fagus sylvatica* und *Quercus robur* sowie die Konifere *Picea abies* ausgewählt. Erstmals wurde die Phloembeladung nicht nur in kleinen, sondern auch in hohen Bäumen dieser Arten untersucht. Im folgenden Teil werden die Ergebnisse aus Abschnitt 4 unter Berücksichtigung bereits publizierter Ergebnisse zu dieser Fragestellung verglichen und diskutiert.

Im ersten Teil der Diskussion werden aufgrund der weitreichenderen Ergebnisse die neuen Erkenntnisse über die Phloembeladung sowie die Funktion und Lokalisation von Saccharose-Transportern in *F. sylvatica* und *Q. robur* behandelt. Diskutiert werden hierbei neben dem Mechanismus der Phloembeladung in hohen Bäumen auch der Einfluss der Wachstumshöhe auf den Zuckermetabolismus und auf die Expression von SUTs. Darüber hinaus wird auf die zellspezifische Expression der SUTs und auf ihre mögliche Rolle bei der Phloembeladung eingegangen.

Im zweiten Teil werden diese Ergebnisse für *P. abies* betrachtet. Fokussiert wird sich dabei ebenfalls auf den Einfluss der Wachstumshöhe auf den Zuckergehalt und -stoffwechsel sowie auf die Expression von Saccharose-Transportern. Zudem wird die zellspezifische Expression von SUTs diskutiert.

5.1 Untersuchung der Phloembeladung in Bäumen: Problemstellung und bisherige Erkenntnisse

Über die Strategien der Phloembeladung mit Saccharose und anderen Zuckern ist in Bäumen wenig bekannt. Verschiedene Publikationen zu diesem Thema wiesen auf einen passiven bzw. symplastischen Beladungsmechanismus aufgrund des offenen *minor-vein*-Typs und folglich einer hohen Anzahl an Plasmodesmen zwischen Geleitzellen und Siebelementen in Blättern von Bäumen hin. Nach Gamaleis Definition der *minor vein*-Typen (Gamalei, 1989) weisen die Blätter von Bäumen den offenen Typ 1 mit einer hohen Zahl an Plasmodesmen zwischen den an der Phloembeladung beteiligten Zellen auf. Zudem wurde durch die Untersuchung der Dichte an Plasmodesmen in den kleinsten Blattadern von Liesche *et al.* (2019) beispielsweise für *Betula pubescens* (dt. Moor-Birke), *Aesculus hippocastanum* (dt. Gewöhnliche Roskastanie) oder *Populus x canescens* (dt. Grau-Pappel) ein passiver symplastischer Beladungsmechanismus postuliert. Ebenso vermuteten Rennie und Turgeon (2009) insbesondere in holzigen Pflanzen eher den passiven als einen aktiven Transport von Zuckern ins Phloem, u.a. in *Fagus sylvatica*, *Quercus rubra* (dt. Roteiche) oder *Juglans ailantifolia* (dt.

Japanische Walnuss). Neben der offenen *minor vein*-Anatomie sind die hohen Zuckergehalte in den Blättern von Bäumen im Vergleich zu krautigen Pflanzen ein Grund für den angenommenen passiven Beladungsmechanismus (Russin und Evert, 1985).

Viele Postulierungen über die Phloembeladung sowohl in krautigen Pflanzen als auch in Bäumen basieren unter anderem auf autoradiografischen Untersuchungen (van Bel *et al.*, 1992; Turgeon und Medville, 1998; Reidel *et al.*, 2009; Rennie und Turgeon, 2009). Hierbei wird überprüft, ob sich ^{14}C -markierte Verbindungen in den *minor veins* der Blätter anreichern. Bei einem aktiven Beladungsmechanismus treten die kleinsten Blattadern nach Exposition mit den ^{14}C -markierten Verbindungen in den Autoradiogrammen sichtbar hervor. Liegt hingegen ein passiver Beladungsmechanismus vor, treten die kleinsten Blattadern nicht hervor, da die radioaktiv markierten Kohlenstoffverbindungen aufgrund der hohen Anzahl an Plasmodesmen leicht zwischen den Zelltypen des Phloems diffundieren können (Rennie und Turgeon, 2009). Allein über die Zahl der Plasmodesmen zwischen den Zelltypen des Phloems Rückschlüsse auf die Phloembeladung zu ziehen hat sich jedoch gerade bei Blättern mit hohen Zuckergehalten eher als willkürlich erwiesen. Goggin *et al.* (2001) fanden in *Liriodendron tulipifera* (dt. Tulpenbaum) zwar eine hohe Anzahl an Plasmodesmen zwischen den Zellen der *minor veins* der Blätter. Jedoch konnte hier in einer autoradiographischen Untersuchung die Anreicherung von ^{14}C -markierter Saccharose in diesen kleinsten Adern festgestellt werden, was einen ersten Hinweis auf die aktive Beladung des Phloems darstellte. Erwähnt werden muss an dieser Stelle jedoch, dass sich die Anreicherung von ^{14}C -Saccharose in den *minor veins* im Rahmen autoradiographischer Untersuchungen allgemein eher für Blätter von Pflanzen eignet, welche geringe Zuckerkonzentrationen aufweisen (Rennie und Turgeon, 2009). Goggin *et al.* (2001) ist diese autoradiographische Untersuchung erst nach großzügiger Entfernung der Epidermis von den Blättern des Tulpenbaumes gelungen. Auch bei *Salix babylonica* L. (dt. Echte Trauerweide) (Turgeon und Medville, 1998) und *Malus domestica* (dt. Kulturapfel) (Reidel *et al.*, 2009) ergaben sich aufgrund des hohen Zuckergehaltes der Blätter Probleme bei der Autoradiographie, sodass ein Entfernen der Epidermis mit einer Rasierklinge notwendig war.

Eine weitere Untersuchungsmethode für die Unterscheidung zwischen einem passiven Weg der Phloembeladung und dem aktiven Beladungsweg ist der Einsatz der SUT-Hemmers PCMBs. Durch die Behandlung der Blätter von Pflanzen, bei welchen die Phloembeladung aktive Schritte durch Saccharose-Transporter enthält, wird durch deren Hemmung die Saccharose-Aufnahme in die Siebelemente des Phloems inhibiert (Turgeon, 1984). Folglich zeigt sich nach der Behandlung mit PCMBs bei der Untersuchung des Phloemexsudats aus Blattvenen oder

Blattstielen eine geringere Saccharose-Konzentration. Goggin *et al.* (2001) konnten durch Behandlung der Blätter des Tulpenbaumes mit PCMBs eine weitgehende, jedoch nicht gänzlich vollständige Hemmung der Exsudation von ^{14}C -markiertem Photoassimilat aus den Blattstielen feststellen. Dies deutete zusätzlich zu den Ergebnissen der Autoradiographie auf einen aktiven Schritt im Transport von Saccharose ins Phloem über den Apoplasten hin, in welchen Saccharose-Transporter involviert sind. PCMBs zeigte in der Untersuchung von Blättern kleiner Bäume von *Magnolia kobus* (dt. Kobushi-Magnolie), *Gnetum gnemon* und *F. sylvatica* (Fink *et al.*, 2018) den gleichen hemmenden Effekt auf die Zuckerexsudation von geschnittenen Blattstielen. Bei diesen Bäumen zeigte sich in elektronenmikroskopischen Aufnahmen der Blattadern ebenfalls eine hohe Dichte an Plasmodesmen.

Denkbar ist es, dass in hohen Bäumen aufgrund der höheren CO_2 -Assimilation und der folglich größeren Mengen produzierter Saccharose eine andere Beladungsstrategie des Phloems stattfindet oder aber, dass passive und aktive Beladung gemeinsam erfolgen. Eine Änderung des Mechanismus der Phloembeladung bzw. das Vorhandensein zweier Beladungstypen nebeneinander wurde in verschiedenen monokotylen und dikotylen Pflanzenarten bereits gezeigt (Winter *et al.*, 1994; Voitsekhovskaja *et al.*, 2009; Werner *et al.*, 2011; Braun *et al.*, 2014).

5.2 NSC-Gehalte in hohen Bäumen der Arten *F. sylvatica* und *Q. robur*

Aufgrund der Schwierigkeiten und widersprüchlichen Ergebnisse autoradiographischer und elektronenmikroskopischer Analysen bei der Untersuchung der Phloembeladung mit Blättern von Bäumen wurde in dieser Arbeit davon abgesehen, diese durchzuführen. Der Fokus für die vorliegende Untersuchung in hohen Bäumen der Arten *F. sylvatica* und *Q. robur* wurde auf die Analyse der Verteilung von Zuckern in den einzelnen Kompartimenten der Mesophyllzellen von Blättern gelegt. Diese Analysen ermöglichen es, die Speicherung sowie den Transport von Kohlenstoffverbindungen innerhalb der fotosynthetisch aktiven Pflanzenorgane zu verstehen. Gemeinsam mit den Ergebnissen der Untersuchung der Zusammensetzung und Konzentration der von Pflanzen transportierten Kohlenhydrate im Phloemsaft können Rückschlüsse auf die Art der Phloembeladung gezogen werden.

Als erster Schritt wurden für diese Untersuchung die NSC-Gehalte (engl.: *non-structural-carbohydrates*) in Blättern, Rinde sowie Holz kleiner (2 m) und hoher (11 – 26 m) *F. sylvatica* und *Q. robur* gemessen. Zu den NSC zählen insbesondere freie ungebundene Zucker und Stärke (Hartmann und Trumbore, 2016). Für die Untersuchung der Phloembeladung sind hier

insbesondere die Saccharose-Konzentrationen in Laub- und Nadelblättern sowie in der Rinde von Interesse.

Neben dem Disaccharid Saccharose wurden die Hexosen Glucose und Fructose als Zucker in den untersuchten Organen der beiden Baumarten identifiziert (Abbildung 4.1 A, Abbildung 4.2 A). Als anorganische Ionen wurden hauptsächlich Kalium und Chlorid in beiden Baumarten gefunden (Abbildung 4.1 C und D, Abbildung 4.2 C und D). In *F. sylvatica* lag die Gesamtzuckerkonzentration verglichen mit den Blättern kleiner Bäume (2 m) signifikant höher. Bei den Stärkegehalten wurden in Blättern und Holz der beiden Laubbaumarten ähnlich hohe Gehalte gemessen, signifikant niedriger lagen diese in der Rinde (Abbildung 4.1 B, Abbildung 4.2 B). Zudem lagen die Stärkegehalten in Blättern von hohen *Q. robur* signifikant niedriger im Vergleich zu dem in kleinen Bäumen. Zusammenfassend kann jedoch festgehalten werden, dass die NSC-Gehalte in kleinen und hohen Bäumen ähnliche Werte aufwiesen und sich im statistischen Vergleich zwischen den jeweiligen verglichenen Wachstumshöhen der Bäume kaum signifikante Änderungen zeigten.

Sala und Hoch (2009) untersuchten den Zusammenhang zwischen der Wachstumshöhe von *Pinus ponderosa* (dt. Gelb-Kiefer) und dem NSC-Gehalt in Nadelblättern, um die Abnahme des Wachstums von Bäumen mit zunehmendem Alter bzw. mit zunehmender Größe zu untersuchen. Diese Untersuchungen zeigten, dass der NSC-Gehalt mit steigender Größe der Bäume zunimmt. Diese Beobachtung konnte in der vorliegenden Arbeit insbesondere auch in den Blättern hoher *F. sylvatica* gemacht werden. Sala und Hoch (2009) schlossen aus ihren Ergebnissen, dass die Bildung von Kohlenstoffverbindungen und die Versorgung der Bäume mit diesen Verbindungen mit zunehmender Wachstumshöhe nicht eingeschränkt wird. Diese Studie bestätigte die schon bestehende Annahme aus vorherigen Untersuchungen (Ryan *et al.*, 2006; Bond *et al.*, 2007), dass die geringere Wachstumsrate hoher Bäume im Vergleich zu kleinen Bäumen nicht auf eine verminderte Bildung von Kohlenstoffverbindungen zurückgeführt werden kann. Woodruff und Meinzer (2011) bestätigten diese positive Korrelation zwischen der Höhe der Bäume und dem zunehmenden NSC-Gehalt auch für Zweige der Gymnosperme *Pseudotsuga menziesii* (dt. Gewöhnliche Douglasie).

Sowohl Sala und Hoch (2009) als auch Woodruff und Meinzer (2011) stellten jedoch eine Zunahme des NSC-Gehaltes unter trockenen Standortbedingungen der untersuchten Baumarten fest. Die für diese Arbeit beprobten Bäume stammen aus dem Solling im Weserbergland sowie aus Wuppertal im Bergischen Land. Bei beiden Standorten handelt es sich um Mittelgebirgsregionen mit verhältnismäßig hohen Niederschlagsmengen über das Jahr verteilt

(Quelle: LANUV NRW). Diese feuchteren Standortbedingungen könnten ein Grund dafür sein, weswegen die *NSC*-Gehalte in den untersuchten Baumarten mit steigender Höhe nur geringe Änderungen zeigten. Ein weiterer Grund, aus welchem der Anstieg des Gesamtzuckergehaltes in den hohen *Quercus robur* weniger groß war als in hohen *Fagus sylvatica*, kann der geringere Größenunterschied zwischen den kleinen und hohen Bäumen sein. Das beprobte hohe Exemplar von *Q. robur* hatte eine Höhe von 13 m, die Proben wurden in 11 m Höhe entnommen, während die beprobten *F. sylvatica* in einer Höhe von 26 m beprobt wurden und eine Gesamthöhe von ca. 30 m aufwiesen.

5.3 Zuckerverteilung in den Mesophyllzellen hoher *F. sylvatica* und *Q. robur*

Für die weitere Untersuchung der Zuckerverteilung in den beiden Laubbaumarten wurde die Verteilung der Photoassimilate in den Mesophyllzellen der Blätter hoher Bäume in *Fagus sylvatica* (26 m Höhe) und *Quercus robur* (11 m Höhe) untersucht (Abs. 4.2). Mittels der Nichtwässrigen-Fraktionierung (Abschnitt 3.9.1) konnten die Zellkompartimente der Mesophyllzellen in drei verschiedene Fraktionen aufgeteilt werden: Zytosol, Vakuole und Chloroplasten (Stroma). Diese Fraktionen wurden anschließend hinsichtlich der Konzentrationen von Photoassimilaten untersucht. Bei beiden Bäumen konnten die Hexosen Glucose und Fructose sowie Saccharose als Kohlenhydrate in den Mesophyllzellen identifiziert werden. Von den Hexosen befanden sich in beiden Arten mehr als 95 % in der Vakuole. Saccharose hingegen befand sich je nach Baumart zu einem Anteil von 60 bis 70 % im Zytosol und zu 30 bis 40 % in der Vakuole. Im Stroma der Chloroplasten fanden sich nur geringe Konzentrationen der genannten Zucker (Abbildung 4.5). Für krautige Pflanzen wie *Spinacia oleracea* (dt. Spinat) (Winter *et al.*, 1994), *Nicotiana tabacum* (dt. Virginischer Tabak) (Heineke *et al.*, 1994) und *Arabidopsis thaliana* (dt. Acker-Schmalwand) (Knaupp *et al.*, 2011) konnten in der prozentualen subzellulären Verteilung von Kohlenhydraten in den Kompartimenten Vakuole, Zytosol und Chloroplasten ähnliche Ergebnisse gezeigt werden. Auch für kleine, ca. 2 m hohe Bäume, konnten Fink *et. al* (2018) für *F. sylvatica* und Öner-Sieben und Lohaus (2014) für *Q. robur* zu den subzellulären Verteilungen von Hexosen und Saccharose in hohen Bäumen der beiden Arten analoge Werte messen.

Werden die Konzentrationen von Hexosen und Saccharose in den genannten Zellorganellen in krautigen Pflanzen mit denselben in Bäumen verglichen, weisen Bäume hier wesentlich höhere Werte auf. Diese lagen für *F. sylvatica* und *Q. robur* in Vakuole und Zytosol im höheren zweistelligen bzw. im dreistelligen Konzentrationsbereich (Tabelle 4.2). Die Konzentrationen an Hexosen in der Vakuole lagen hierbei mit ca. 230 mM bei *F. sylvatica* und 93 mM bei

Q. robur. Die höchsten Konzentrationen an Saccharose wurden hingegen im Zytosol gemessen und lagen in *F. sylvatica* bei ca. 122 mM und in *Q. robur* bei 236 mM. Auch in kleinen *F. sylvatica* und *Q. robur* zeigten sich ähnliche Werte (Öner-Sieben und Lohaus, 2014; Fink *et al.*, 2018), ebenso wie in kleinen Bäumen von *Prunus persica* (dt. Pfirsich, (Nadwodnik und Lohaus, 2008). Hingegen befanden sich diese Konzentrationen in krautigen Pflanzen im einstelligen oder mittleren zweistelligen Bereich zwischen 2 und 53 mM (Winter *et al.*, 1994; Leidreiter *et al.*, 1995; Voitsekhovskaja *et al.*, 2006; Knaupp *et al.*, 2011; Fink *et al.*, 2018).

Die insgesamt höheren Saccharose- und Hexose-Konzentrationen in Bäumen sind in hohen *F. sylvatica* und *Q. robur* hauptsächlich in der Vakuole gespeichert, welche von den untersuchten Zellkompartimenten auch das größte Volumen einnimmt (Tabelle 4.1) Die Vakuole ist für die Speicherung von Zuckern, die Aufrechterhaltung des Zellturgors sowie den Ausgleich des Wasserpotentials zwischen sich selbst und dem Zytosol verantwortlich (Fu *et al.*, 2011; Hedrich *et al.*, 2015). Hierzu vermuteten Fu *et al.* (2011), dass hohe Konzentrationen an Zuckern und anderer polarer Metabolite in der Vakuole von Bäumen dafür benötigt werden, um das Wasserpotential zwischen Vakuole und Zytosol auszugleichen. Im Falle der beiden betrachteten Baumarten sind fast ausschließlich Hexosen als Zucker in der Vakuole vorhanden. Im Zytosol befinden sich hingegen höhere Konzentrationen an Saccharose, welches einen Ausgleich des Wasserpotentials zwischen den beiden Zellorganellen durch Akkumulation polarer Substanzen in der Vakuole notwendig macht. Die allgemein sehr hohen Zuckergehalte in den Blättern von Bäumen ließen Sala und Hoch (2009) schlussfolgern, dass Bäume weitaus mehr Kohlenstoff assimilieren, als sie für Wachstum und andere Funktionen benötigen und dass dessen Speicher im Jahresverlauf nie verbraucht werden. Die Gründe hierfür sind noch nicht ausreichend geklärt.

Aus den Untersuchungen der NSC-Gehalte in kleinen und hohen *Fagus sylvatica* und *Quercus robur* kann geschlussfolgert werden, dass die Wachstumshöhe keinen bzw. nur einen geringen Einfluss auf diese Gehalte hat. Auch die Bestimmungen der subzellulären Konzentrationen von Saccharose und Hexosen in den Zellkompartimenten von Blatt-Mesophyllzellen zeigten, dass hier in kleinen und hohen Bäumen vergleichbare Gehalte der Zucker vorliegen.

5.4 Aktive Phloembeladung in hohen Bäumen aus *F. sylvatica* und *Q. robur*

Die Saccharose-Konzentrationen in den Blatt-Mesophyllzellen werden in der weiteren Diskussion um die Strategien der Phloembeladung in hohen *F. sylvatica* und *Q. robur* genauer betrachtet. Die Begründung hierfür liegt darin, dass das Phloem der beiden Baumarten hauptsächlich mit Saccharose aus den Mesophyllzellen beladen wird und dass das Disaccharid

hier somit die Haupttransportform von Zuckern darstellt (Lucas *et al.*, 2013; Liesche, 2017). Abbildung 4.6 des Ergebnisteils zeigt bei beiden Baumarten einen Konzentrationsgradienten zwischen der Saccharose aus dem Zytosol der Mesophyllzellen und der Saccharose im Phloemsaft, welcher von kleinen Bäumen gewonnen wurde. Die Saccharose-Konzentrationen im Phloemsaft lagen dabei bei 789 mM in *F. sylvatica* und bei 1015 mM bei *Q. robur* und somit 4- bis 6-mal höher als die Konzentrationen im Zytosol der Mesophyllzellen. Dieser Konzentrationsunterschied kann nicht durch passive Diffusion der Saccharose ins Phloem begründet werden, sondern erfordert einen aktiven Schritt der Beladung des Phloems durch spezifische Transportproteine wie Saccharose-Transporter. Bei der Beladung durch Diffusion würde sich im Zytosol der Mesophyllzellen im Gegensatz zur aktiven, apoplastischen Beladung eine höhere Saccharosekonzentration verglichen zum Phloemsaft zeigen, da die Saccharose dabei entlang eines Konzentrationsgradienten von den Mesophyllzellen über die Geleitzellen ins Phloem diffundiert (Rennie und Turgeon, 2009; Slewinski *et al.*, 2013). Bei Betrachtung der Ergebnisse der genannten Untersuchungen muss jedoch beachtet werden, dass der Phloemsaft, welcher für den Vergleich mit den Saccharose-Konzentrationen in den Mesophyllzellen hoher Bäume verwendet wurde, von den Blättern kleiner Bäume stammt (Öner-Sieben und Lohaus, 2014; Fink *et al.*, 2018). Für die Gewinnung des Phloemsaftes wurde dabei die Laser-Aphiden-Technik verwendet. (Barlow und McCully, 1972; Fisher und Frame, 1984; Lohaus *et al.*, 1995). Bei dieser Methode werden Blattläuse auf den Blättern der zu untersuchenden Pflanzen ausgesetzt. Diese Läuse stechen gezielt die Siebröhren des Phloems an. Über einen Laser wird der Rüssel der Läuse anschließend entfernt und der aus den Siebröhren ausgetretene Phloemsaft gesammelt. Diese Methode stellt eine sehr gute und präzise Möglichkeit dar, reinen Saft des Phloems aus intakten Blättern lebender Pflanzen zu gewinnen (Lohaus und Schwerdtfeger, 2014).

Für hohe Bäume kann die Laser-Aphiden-Technik jedoch nicht verwendet werden, da es nicht möglich ist, Blattläuse in einer derart großen Höhe auf den Blättern der Pflanzen zu platzieren und so gezielt an den Phloemsaft zu gelangen. Für die beiden untersuchten Arten *F. sylvatica* und *Q. robur* konnte daher noch kein Phloemsaft gesammelt werden. Eine neue Methode, um diesen auch in hohen Laubbäumen zu analysieren, stellten Gersony *et al.* (2021) vor. Ihnen ist es gelungen, die Saccharose-Konzentration im Phloemsaft hoher Roteichen (*Quercus rubra*) mittels Raman-Spektroskopie zu analysieren. Die Ergebnisse zeigten Saccharose-Konzentrationen in den Siebelementen des Phloems von über 1100 mM und lagen somit in einem ähnlichen Bereich wie die von Öner-Sieben und Lohaus (2014) in kleinen *Q. robur* gemessenen Werte. Darüber hinaus zeigten Nikinmaa *et al.* (2014) in einem Xylem-Phloem-

Interaktionsmodell mit *Pinus sylvestris* (dt. Waldkiefer) Saccharose-Konzentrationen im Phloem von 1400 mM. Insbesondere aufgrund der Erkenntnisse von Gersony *et al.* (2021) kann davon ausgegangen werden, dass auch in hohen Bäumen der Arten *F. sylvatica* und *Q. robur* die Saccharose-Gehalte im Phloemsaft in einem ähnlich hohen oder sogar höheren Bereich liegen wie die Werte, die in kleinen Bäumen bereits gemessen wurden. Somit kann ein rein passiver Beladungsmechanismus für beide Baumarten ausgeschlossen werden.

Ein Argument, welches gegen einen aktiven, apoplastischen Schritt bei der Phloembeladung in beiden Baumarten spricht, ist die hohe Zahl an Plasmodesmen zwischen den Bündelscheiden- bzw. Phloemparenchymzellen und den Geleitzellen in den *minor veins* der Blätter, wie sie von Fink *et al.* (2018) und Öner-Sieben und Lohaus (2014) gezeigt wurden. Dieses Merkmal würde laut Gamalei (1989) für den passiven Beladungstyp 1 mit einer offenen *minor vein*-Anatomie sprechen. Eine Theorie, weswegen die Phloembeladung trotz einer hohen Dichte an Plasmodesmen in den *minor veins* von Blättern aktiv verlaufen kann, wurde von Turgeon und Medville (2004) aufgestellt. Sie vermuteten, dass die Plasmodesmen zwischen den Geleitzellen des Phloems und den sie umgebenden Zellen entweder dauerhaft oder zeitweise geschlossen werden, um einen Saccharoseverlust aus den Zellen des Phloems zu vermeiden. Dieser Fall könnte eintreten, wenn der osmotische Druck in den Geleitzellen höher ist als in den sie umgebenden Zellen, aus welchen die Saccharose entladen wird. Somit würde die Öffnung und Schließung der Plasmodesmen über den osmotischen Druck und damit über die Zuckerkonzentration in den genannten Zellen reguliert werden. Bei geschlossenen Plasmodesmen muss die Saccharoseaufnahme ins Phloem aktiv über den Apoplasten erfolgen. Ist der osmotische Druck zwischen den Geleitzellen und Mesophyllzellen gleich hoch, stellten Voitsekhovskaja *et al.* (2006) fest, dass ohne eine Regulation der Öffnung und Schließung von Plasmodesmen und ihre dauerhafte Öffnung die Saccharose eher wieder zurück in die Mesophyllzellen diffundieren würde als in die Geleitzellen des Phloems. Auch für *Fagus sylvatica* und *Quercus robur* ist es denkbar, dass die vorhandenen Plasmodesmen nicht oder nur temporär geöffnet werden, da die Konzentration der Saccharose im Phloemsaft bei beiden Arten höher zu sein scheint als die Konzentration im Zytosol der Mesophyllzellen. Durch die Schließung der Plasmodesmen würde vermieden werden, dass die Saccharose aus dem Phloem zurück in die Mesophyllzellen diffundiert.

Eine weitere Größe, welche für die Analyse des Transportes von Stoffen in pflanzlichem Gewebe bestimmt werden kann, ist die Osmolalität. Sie ist definiert als die Konzentration aller gelösten, osmotisch aktiven Teilchen bezogen auf 1 kg Lösungsmittel (Rasouli, 2016) und wird

von allen in Blättern vorhandenen Inhaltsstoffen beeinflusst, zu welchen neben Zuckern auch Ionen oder Aminosäuren bzw. Proteine zählen (Lintunen *et al.*, 2016). Die Osmolalität wurde für den Blattsaft der Blätter kleiner und hoher Bäume von *F. sylvatica* und *Q. robur* bestimmt und lag in hohen Buchen bei ca. 1030 mOsmol *kg⁻¹ und in hohen Eichen bei ca. 1100 mOsmol*kg⁻¹ (Abbildung 4.4 A und B). Bei den Messungen zeigte sich bei beiden Arten in den Blättern hoher Bäume eine signifikant höhere Osmolalität. Insbesondere bei *F. sylvatica* kann die mit der Wachstumshöhe gestiegene Osmolalität mit signifikant höheren Gehalten an Zuckern sowie an anorganischen Kationen und Anionen in den Blättern hoher Bäume verglichen mit den Blättern kleiner Bäume erklärt werden. Bei *Q. robur* zeigten sich tendenziell in den Höhenproben auch größere Gehalte an Zuckern und anorganischen Ionen, die jedoch verglichen mit den Proben kleiner Bäume nicht signifikant höher waren.

Fu *et al.* (2011) untersuchten die Rolle verschiedener Wassertransport-Charakteristika in 45 Arten ausgewählter Bäume sowie krautiger Pflanzen und fokussierten sich dabei unter anderem auch auf die Osmolalität. Die Ergebnisse zeigten, dass die Osmolalität in den Blättern von Bäumen im Vergleich zu krautigen Pflanzen aufgrund der höheren Konzentrationen an Transportzuckern signifikant höher liegt. Die Konzentrationen von anorganischen Ionen veränderte sich hingegen mit steigender Wachstumshöhe nur geringfügig. Die gemessenen Osmolalitäten in den untersuchten Baumarten lagen in dieser Studie zwischen 800 und ca. 1500 mOsmol*kg⁻¹ und somit in einem ähnlichen Bereich wie die in dieser Arbeit gemessenen Werte in *F. sylvatica* und *Q. robur*. Gleichzeitig wurde ein in den Blättern von Bäumen geringerer Wassergehalt gemessen. Fu *et al.* (2011) schlossen daraus, dass Bäume das Phloem passiv beladen, da die Konzentration der Transportzucker im Zytosol der Mesophyllzellen hoch genug ist, um passive Diffusion ins Phloem zu ermöglichen. Allerdings wurde diese Schlussfolgerung insbesondere für Bäume postuliert, welche neben Saccharose auch Zuckeralkohole transportieren, wie beispielsweise verschiedene Rosaceae-Arten, nicht aber die in dieser Arbeit untersuchten Fagaceae. Zudem wurde in den untersuchten Baumarten nicht die Konzentration sowie die Osmolalität des Phloensaftes untersucht. Daher bleibt unklar, ob sich hier besonders in den Arten, die nur Saccharose als Transportzucker ins Phloem befördern, im Phloemsaft eine höhere Saccharose-Konzentration als im Zytosol der Mesophyllzellen zeigen würde.

Öner-Sieben und Lohaus (2014) haben die Osmolalität im Phloemsaft von *Q. robur* gemessen, indem sie eine wässrige Lösung aus Zuckern herstellten, deren Konzentration derer des Phloensaftes entsprach, der aus den Blättern gewonnen wurde. Hierbei konnte eine Osmolalität

von 1278 mOsmol*kg⁻¹ gemessen werden. Wird dieser Wert nun mit dem Wert von 1100 mOsmol*kg⁻¹ im Blattsaft hoher *Q. robur* verglichen, kann geschlussfolgert werden, dass die Osmolalität im Phloemsaft höher liegt als im Blattsaft. Es muss zudem davon ausgegangen werden, dass in der simulierten Phloemsaft-Lösung die Osmolalität kleiner ist als die tatsächliche Konzentration im Phloemsaft der Blätter aus *Q. robur*. Der Grund hierfür ist, dass bei dem simulierten Phloemsaft von Öner-Sieben und Lohaus (2014) nur Zucker zugesetzt wurden, dieser aber darüber hinaus auch Aminosäuren und Ionen enthält, die zum Anstieg der Osmolalität beitragen. Diese sind zwar in geringeren Konzentrationen im Phloemsaft vorhanden, tragen jedoch trotzdem zu einer steigenden osmotischen Konzentration bei.

Als Fazit aus der Untersuchung der Phloembeladung kann geschlossen werden, dass ein rein passiver Mechanismus für beide Laubbaumarten ausgeschlossen werden kann. Ein maßgeblicher Grund ist der mutmaßlich aufsteigende Konzentrationsgradient zwischen der Saccharose im Zytosol der Mesophyllzellen und im Phloemsaft. Für beide Baumarten ist es wahrscheinlich, dass die Saccharose-Konzentration im Phloemsaft hoher Bäume ebenso hoch oder sogar höher ist als die gemessene Konzentration in kleinen Bäumen. Die von Gersony *et al.* (2021) vorgestellte Methode der Raman-Spektroskopie würde für die hohen *Fagus sylvatica* und *Quercus robur* in zukünftigen Untersuchungen eine geeignete Möglichkeit für die Untersuchung der Saccharose-Konzentrationen im Phloemsaft darstellen.

5.5 Gewebespezifische und zellspezifische Expression sowie Charakterisierung von Saccharose-Transportern

5.5.1 Charakterisierung von Saccharose-Transportern aus *F. sylvatica* und *Q. robur*

Saccharose-Transporter werden mit vielseitigen Aufgaben in Pflanzen in Verbindung gebracht. In die aktive Beladung des Phloems sind Saccharose-Transporter vom Typ I involviert. In dikotylen Pflanzen sind neben SUTs vom Typ I auch Typ II- und Typ III- SUTs am Transport von Saccharose beteiligt. Bereits in vorherigen Arbeiten wurden Saccharose-Transporter der genannten Typen bzw. Gruppen sowohl in Laubbäumen als auch in Koniferen beschrieben und ihre Expression unter verschiedenen Umweltbedingungen untersucht (Decourteix *et al.*, 2006; Payyavula *et al.*, 2011; Öner-Sieben und Lohaus, 2014; Dobbstein *et al.*, 2019; Han *et al.*, 2022). SUTs der Typen I, II und III konnten in *Q. robur* identifiziert werden, während in *F. sylvatica* der SUT vom Typ I als vollständige cDNA gewonnen werden konnte (Öner-Sieben und Lohaus, 2014; Dobbstein *et al.*, 2019).

In dieser Arbeit ist es gelungen, die vollständige cDNA zweier weiterer SUTs aus *F. sylvatica* zu isolieren (Abs. 4.3). Strukturell wiesen beide Transporter die für SUTs typischen Merkmale

auf (Riesmeier *et al.*, 1993; Sauer und Stolz, 1994): Die Topologie-Vorhersage (Abbildung 4.7 und Abbildung 4.8) zeigte, dass beide Transporter aus 12 Transmembran- α -Helices bestehen, die in zwei Sechserblöcken angeordnet sind, welche durch einen zytoplasmatischen Loop voneinander getrennt sind. Die Benennung der beiden Transporter als FsSUT2 und FsSUT4 erfolgte aufgrund ihrer Clusterung in der phylogenetischen Analyse (Abbildung 4.9). Der SUT2 aus *F. sylvatica* clusterte hierbei in die Gruppe der Typ-II-SUTs, FsSUT4 in die Gruppe der Typ-III-SUTs. Beide Transporter zeigen eine hohe Zahl an Sequenzhomologien (82 % bei FsSUT2, 86 % bei FsSUT4) verglichen mit den Transportern des gleichen Typs aus *Q. robur*, welche ebenfalls zu der Familie der Fagaceae zählen. Somit bilden der FsSUT2 mit dem QrSUT2 sowie der FsSUT4 mit dem QrSUT4 in den Gruppen der Typ-II- bzw. Typ-III-SUTs jeweils eine Subgruppe.

Bei Saccharose-Transportern vom Typ II sind der N-Terminus sowie der zytoplasmatische Loop im Vergleich zu Transportern der Typen I und II verlängert. Dies konnte in vorherigen Arbeiten im AtSUC3 aus *Arabidopsis thaliana* (Meyer *et al.*, 2000), LeSUT2 aus *Lycopersicon esculentum* (dt. Kultur-Tomate) (Barker *et al.*, 2000), den Baumarten *Picea abies* und *Quercus robur* (Dobbelstein *et al.*, 2019) sowie in *Lolium perenne* (dt. Weidelgras) (Berthier *et al.*, 2014) gezeigt werden. Diese strukturelle Besonderheit war auch am FsSUT2 aus *F. sylvatica* zu beobachten. So besteht der zytoplasmatische Loop bei dem Transporter FsSUT4 aus 42 Aminosäuren, während er beim FsSUT2 mit 112 Aminosäuren etwa die 2,5-fache Länge aufweist. Ebenso verhält sich die Länge des N-Terminus: dieser ist beim FsSUT4 28 Aminosäuren lang, beim FsSUT2 umfasst er 74 Aminosäuren.

Um spezifische Aussagen über die Funktionalität der SUTs aus *Q. robur* und *F. sylvatica* hinsichtlich der Aufnahmefähigkeit von Saccharose treffen zu können, wurde die heterologe Expression der Transporter in Hefezellen durchgeführt. Für den Transporter SUT1 aus *Q. robur* wurden von Öner-Sieben (2014) bereits die Funktionalität in Hinblick auf die Saccharose-Aufnahmefähigkeit bestätigt sowie die entsprechenden enzymkinetischen Parameter untersucht. Als K_m -Wert wurde dabei für den QrSUT1 ein Wert von 6,7 mM ermittelt.

In dieser Arbeit konnte die Saccharose-Transport-Aktivität für die putativen SUT-Sequenzen QrSUT2 und QrSUT4 sowie für FsSUT1, FsSUT2 und FsSUT4 erfolgreich demonstriert werden. Dies hat gezeigt, dass es sich bei den Transportern um funktionale Proteine bzw. Saccharose-Transporter handelt. Die K_m -Werte für die untersuchten SUTs lagen zwischen 1,6 und 6,5 mM. Einen Vergleich der K_m -Werte der SUT aus *F. sylvatica* und *Q. robur* mit Werten

von SUTs aus weiteren ausgewählten dikotylen Pflanzen wird in der folgenden Tabelle gezeigt. Die in dieser Arbeit untersuchten SUTs sind fett gedruckt.

Tabelle 5.1 Km-Werte ausgewählter SUTs

| Art | Name | Typ | K_m [mM] | Quelle |
|-----------------------------|---------------|-----|---------------|----------------------------------|
| <i>Quercus robur</i> | QrSUT1 | I | 6,7 | Öner-Sieben, 2014 |
| <i>Fagus sylvatica</i> | FsSUT1 | I | 2,3 | diese Arbeit |
| <i>Fraxinus excelsior</i> | FeSUT1 | I | 2,9 | Öner-Sieben <i>et al.</i> , 2015 |
| <i>Arabidopsis thaliana</i> | AtSUC1 | I | 0,5 | Sauer und Stolz, 1994 |
| <i>Arabidopsis thaliana</i> | AtSUC2 | I | 0,77 | Sauer und Stolz, 1994 |
| <i>Rosa hybrida</i> | RhSUC2 | I | 3,0 | Henry <i>et al.</i> , 2011 |
| <i>Solanum tuberosum</i> | StSUT1 | I | 1,0 | Riesmeier <i>et al.</i> , 1993 |
| <i>Spinacia oleracia</i> | SoSUT1 | I | 1,5 | Riesmeier <i>et al.</i> , 1992 |
| <i>Plantago major</i> | PmSUC2 | I | 1,0 | Gahrtz <i>et al.</i> , 1994 |
| <i>Quercus robur</i> | QrSUT2 | II | 2,5 | diese Arbeit |
| <i>Fagus sylvatica</i> | FsSUT2 | II | 2,7 | diese Arbeit |
| <i>Plantago major</i> | PmSUC3 | II | 5,5 | Barth <i>et al.</i> , 2003 |
| <i>Arabidopsis thaliana</i> | AtSUC3 | II | 1,9 | Meyer <i>et al.</i> , 2000 |
| <i>Arabidopsis thaliana</i> | AtSUT2 | II | 11,7 | Schulze <i>et al.</i> , 2000 |
| <i>Quercus robur</i> | QrSUT4 | III | 6,5 | diese Arbeit |
| <i>Fagus sylvatica</i> | FsSUT4 | III | 1,6 | diese Arbeit |
| <i>Daucus carota</i> | DcSUT1 | III | 0,5 | Shakya und Sturm, 1998 |
| <i>Arabidopsis thaliana</i> | AtSUT4 | III | 11,6 | Weise <i>et al.</i> , 2000 |
| <i>Solanum tuberosum</i> | StSUT4 | III | 6,0 | Weise <i>et al.</i> , 2000 |

In Tabelle 5.1 wird deutlich, dass die K_m -Werte für Saccharose in den einzelnen Gruppen der SUTs stark variieren. Aus Untersuchungen an krautigen dikotylen Pflanzen konnte geschlussfolgert werden, dass SUTs des Typs I zu den für Saccharose hochaffinen Transportern zählen und diese maßgeblich in die Beladung des Phloems mit Saccharose involviert sind (Riesmeier *et al.*, 1994; Gottwald *et al.*, 2000). In der Gruppe der Typ I-SUTs sind die in den Bäumen *Q. robur*, *F. sylvatica* und *F. excelsior* (dt. Gemeine Esche) gemessenen Werte im Vergleich zu den Werten in *A. thaliana*, *S. tuberosum* (dt. Kartoffel) und *S. oleracia* (dt. Spinat) höher. Daraus kann geschlossen werden, dass die Typ I-SUTs in Bäumen eine geringere

Affinität zu Saccharose aufweisen als die Transporter in krautigen Pflanzen und somit eine höhere Menge an Saccharose benötigen, um ihr Aktivitätsmaximum zu erreichen.

In krautigen Pflanzen zeigte sich für die Gruppe der SUTs vom Typ II teilweise eine deutlich geringere Affinität zu Saccharose durch höhere K_m -Werte verglichen mit den Werten der SUTs vom Typ I (Schulze *et al.*, 2000; Barth *et al.*, 2003). Für die beiden charakterisierten SUTs aus *F. sylvatica* und *Q. robur* konnte dies allerdings nicht bestätigt werden. Der FsSUT2 weist mit 2,7 mM einen ähnlichen K_m -Wert aus wie der FsSUT1 aus der Gruppe der Typ I-SUTs. Für den QrSUT2 wurde mit 2,5 mM im Vergleich zum QrSUT1 mit 6,7 mM sogar ein deutlich niedrigerer K_m -Wert gemessen. Eine mögliche Erklärung für die verhältnismäßig niedrigen K_m -Werte in den beiden Laubbaumarten wäre, dass der SUTs vom Typ II hier andere biochemische Funktionen aufweisen als in krautigen Pflanzen. Auf die Funktionen des SUT2 wird im Abschnitt 5.5.2 genauer eingegangen.

Auch für die Saccharose-Transporter FsSUT4 und QrSUT4 der Gruppe III war die Überprüfung ihrer Funktionalität erfolgreich. Hierbei weist der FsSUT4 mit einem K_m -Wert von 1,6 mM eine hohe Affinität zu Saccharose auf, wohingegen der QrSUT4 mit einem K_m -Wert von 6,5 mM eine niedrigere Affinität zu Saccharose zeigte. In den krautigen Pflanzen *A. thaliana* und *S. tuberosum* konnten wie bei *Q. robur* ebenfalls verhältnismäßig hohe K_m -Werte für den SUT4 gemessen werden. Saccharose-Transporter der Gruppe III konnten über GFP-Fusion intrazellulär im Tonoplasten lokalisiert werden. Diese Beobachtung wurde sowohl bei krautigen mono- und dikotylen Pflanzen wie *A. thaliana*, *Hordeum vulgare* (dt. Gerste) oder *Beta vulgaris* (dt. Zuckerrübe) gemacht (Getz und Klein, 1995; Endler *et al.*, 2006; Schneider *et al.*, 2012) sowie auch in der Pappel (*Populus tremula x alba*) als einem Vertreter von verholzten Pflanzen (Payyavula *et al.*, 2011; Frost *et al.*, 2012). Der SUT4 wäre somit für den Transport von Saccharose aus der Vakuole ins Zytoplasma zuständig. Im Falle der in dieser Arbeit untersuchten Transporter FsSUT4 und QrSUT4 ist die intrazelluläre Lokalisation in pflanzlichen Protoplasten bisher nicht gelungen. Die gelungene Lokalisation an der Membran von Hefezellen könnte aufgrund der evolutionären Distanz von Pflanzen und Hefen als *fehltargeting* interpretiert werden (Kühn und Grof, 2010). Von Chincinska *et al.* (2008) konnte der StSUT4 aus Kartoffel jedoch in der Plasmamembran pflanzlicher Zellen lokalisiert werden. Zudem zeigte sich an Untersuchungen des GtSUT4 aus der Orchideenart *Gastrodia elata* eine Doppellokalisierung des Transporters sowohl in der Vakuole als auch in der Plasmamembran pflanzlicher Protoplasten (Ho *et al.*, 2021). Um Rückschlüsse auf die Funktion der SUT4 aus

F. sylvatica und *Q. robur* ziehen zu können, muss insbesondere ihre intrazelluläre Lokalisation in pflanzlichen Zellen genauer betrachtet werden.

5.5.2 Expression von Saccharose-Transportern in hohen *F. sylvatica* und *Q. robur*

Im Rahmen der qRT-PCR-Messungen wurde zunächst überprüft, ob die Wachstumshöhe der beiden Baumarten *Fagus sylvatica* und *Quercus robur* einen Einfluss auf die Expression von Saccharose-Transportern hat. Abbildung 4.12 zeigt, dass die untersuchten SUT1, SUT2 und SUT4 in den untersuchten Geweben Blatt, Rinde und Holz in kleinen und hohen Bäumen exprimiert werden und dass sich die Expression in beiden untersuchten Höhen auf einem ähnlichen Niveau befindet. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass SUTs sowohl in kleinen, jungen Bäumen als auch hohen, älteren Bäumen in die gleichen physiologischen Prozesse involviert sind. Die organspezifische Expression der untersuchten SUTs in Blättern wurde mit der in Rinde und Holz verglichen (Abbildung 4.13). Hierbei wurden sowohl die Proben, welche von kleinen Bäumen gesammelt wurden, miteinander verglichen als auch die Proben hoher Bäume. Bei den hohen *F. sylvatica* wurde zudem die Expression junger weiblicher Blüten mit in den Vergleich einbezogen. Auch hier zeigen sich bei den kleinen sowie bei den hohen Bäumen ähnliche Expressionsmuster der SUTs.

Funktionen des SUT1 und SUT2 in der Phloembeladung

Insbesondere bei dem Transporter SUT1 zeigten sich in Bezug auf die organspezifische Expression signifikante Unterschiede. In kleinen und hohen Bäumen von *F. sylvatica* war die Expression des SUT1 in der Rinde signifikant höher als im Kalibrator Blatt. In *Q. robur* zeigte sich dieser signifikante Unterschied bei kleinen Bäumen (Abbildung 4.13 A, D).

Als „Rinde“ wird sämtliches Gewebe außerhalb des vaskulären Kambiums bezeichnet, zu welchem neben dem Periderm als sekundäres Abschlussgewebe auch das sekundäre Phloem, das sog. Transportphloem, zählt (Brennan *et al.*, 2020). Als Teil des Leitgewebes von Pflanzen ist die Rinde bzw. das sekundäre Phloem für den Transport von Photoassimilaten in *sink*-Gewebe verantwortlich (Rosell *et al.*, 2014). Die hohe Expression des SUT1 in der Rinde kann ein Hinweis darauf sein, dass der SUT1 nicht nur in der Phloembeladung in den *minor veins* von Blättern eine Rolle spielt, sondern ebenso an der Rückgewinnung von aus dem Transportphloem ausgetretener Saccharose beteiligt ist. Diese Hypothese konnten Gould *et al.* (2012) bestätigen und zeigten anhand der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana*, dass der Saccharose-Transporter AtSUC2, welcher ebenfalls zu der Gruppe der Typ-I-SUTs gehört, für den Rücktransport ausgetretener Saccharose ins Transportphloem verantwortlich ist. Für denselben Saccharose-Transporter zeigten Stadler und Sauer (1996) bereits, dass er ebenfalls in

den Geleitzellen des Phloems von Blättern lokalisiert und somit in die aktive Phloembeladung involviert ist. Der SUT1 aus den monokotylen Pflanzen Weizen (Aoki *et al.*, 2004) und Reis (Scofield *et al.*, 2007) wurde ebenfalls in den Geleitzellen und Siebelementen des Phloems in Blättern sowie in der Sprossachse lokalisiert und exprimiert. Auch für den SUT1 aus *F. sylvatica* und *Q. robur* ist es möglich, dass dieser für die Phloembeladung in den *minor veins* von Blättern und ebenso für die Wiederbeladung des Transportphloems mit Saccharose zuständig ist. In *F. sylvatica* kann diese Hypothese durch die Ergebnisse der zellspezifischen Expression der mRNA des SUT1 im Blatt und der Sprossachse gestützt werden (Abbildung 4.16 A, B; Abbildung 4.17). Die signifikant höhere Expression des SUT1 in Rinde im Vergleich zum Blatt in *F. sylvatica* und *Q. robur* kann durch den höheren Anteil an Phloemzellen in der Rinde erklärt werden. In den für die qPCR-Messungen verwendeten Rindenproben bestand ca. ein Drittel bis die Hälfte des Gewebes aus Phloem. Bei den Blattproben hingegen handelt es sich bei einem Großteil des Gewebes um Mesophyll. Die *minor veins*, in welchen die mRNA des SUT1 im Rahmen der *in-situ*-Hybridisierung lokalisiert wurde, nehmen nur einen sehr kleinen Teil des Blattes ein. Wird nun davon ausgegangen, dass der SUT1 in Blättern ausschließlich in den Zellen des Phloems exprimiert wird, fällt die Expression des Transporters in der Rinde aufgrund des hier verhältnismäßig größeren Anteils an Phloemzellen im Vergleich zum Blatt höher aus.

Bei Betrachtung der Expression des SUT2 sind in *F. sylvatica* im organspezifischen Vergleich der Expressionen waren keine signifikanten Unterschiede zu erkennen (Abbildung 4.13 B, E). In *Q. robur* zeigten sich in Rinde und Blatt signifikant niedrigere Expressionen. Die zellspezifische Expression des SUT2 in *F. sylvatica* zeigte im Blatt, dass der Transporter in den Zellen des Phloems sowie in den Mesophyllzellen und im Palisadenparenchym exprimiert wird (Abbildung 4.16 C, D). Zudem konnte die zellspezifische Expression des FsSUT2 im Querschnitt der zweijährigen Sprossachse in den Zellen des Phloems gezeigt werden (Abbildung 4.18). Eine eher gleichbleibende Expression des SUT2 mit nur geringen signifikanten Änderungen zeigte sich auch in der Untersuchung jahreszeitlichen Veränderung der SUT-Expressionen in kleinen *Q. robur* (Dobbelstein *et al.*, 2019). Daraus wurde geschlossen, dass der SUT2 eher basale Funktionen in der Pflanze wahrnimmt. In der Gruppe der SUTs von Angiospermen wurde für die Typ-II-SUTs, zu welcher auch der FsSUT2 sowie der QrSUT2 gehören, eher eine geringe Affinität zu Saccharose festgestellt (Barker *et al.*, 2000; Schulze *et al.*, 2000; Barth *et al.*, 2003). Bei den beiden untersuchten SUTs dieser Arbeit waren die K_m -Werte für Saccharose allerdings eher niedrig und vergleichbar mit den K_m -Werten für Typ-I-SUTs (Abs. 5.5.1, Tabelle 5.1), was auf eine hohe Affinität zu Saccharose hindeutet. Die

zellspezifische Expression des FsSUT2 im Phloem der Sprossachse (Abbildung 4.18) deutet darauf hin, dass dieser SUT ebenfalls wie der FsSUT1 an der Wiederbeladung des Transportphloems mit Saccharose beteiligt ist. Da der FsSUT2 zudem im Phloem der *minor veins* von Blättern (Abbildung 4.16 C) exprimiert wurde, kann auch eine Rolle des SUT2 in der Phloembeladung diskutiert werden. Zu dieser Schlussfolgerung kamen auch Ma *et al.* (2016) in ihrer Charakterisierung des MdSUT2 aus *Malus domestica* (dt. Kulturapfel). Meyer *et al.* (2000) konnten den AtSUC3 aus *A. thaliana* in den Bündelscheidenzellen lokalisieren und schlossen daraus eine Beteiligung des SUTs am Transport von Saccharose von den Mesophyllzellen ins Phloem. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass der SUT2 ähnliche Funktionen in den Bäumen wahrzunehmen scheint wie der SUT1. Aufgrund der doppelten Lokalisation des SUT2 aus *F. sylvatica* in Beladungs- und Transportphloem kann zu der Annahme gelangt werden, dass er sowohl an der Phloembeladung im Sammelpfloem als auch an der Wiederbeladung des Transportphloems beteiligt zu sein scheint.

Funktionen von SUTs im Holz

Auch in Holz sind die drei untersuchten SUTs exprimiert. Der SUT1 zeigt in kleinen *F. sylvatica* und *Q. robur* eine signifikant höhere Expression im Vergleich zum Kalibrator Blatt. In hohen Bäumen befindet sich die Expression des SUT1 auf einem ähnlichen Niveau wie der Kalibrator (Abbildung 4.13 A, D). Die zellspezifische Expression über *in-situ*-Hybridisierung ist hier in beiden Baumarten nicht gelungen.

Das Xylem bildet das Holz bei Bäumen und besteht bei fortschreitendem Dickenwachstum zu einem großen Teil aus toten, verholzten Zellen. Es ist hauptsächlich für den Wassertransport in Pflanzen zuständig. Neben diesen abgestorbenen Zellen besitzt das Xylem jedoch auch lebende parenchymatische Zellen, die u.a. für die Speicherung von Stärke zuständig sind (Plavcová *et al.*, 2016). Aus diesem Grund gilt Holz neben Blüten oder Wurzeln auch als *sink*-Gewebe. In einer Studie von Decourteix *et al.* (2006) zur Regulation des Zuckertransportes im Xylem im Winter konnten sowohl die mRNA als auch das Protein des JrUT1 aus *Juglans regia* (dt. Echte Walnuss) in den Parenchymzellen des Xylems lokalisiert werden, welche direkt an die Tracheen assoziiert sind, den sog. „*vessel associated cells*“. Dabei handelt es sich um lebende Zellen, die in direktem Kontakt mit den für den Wassertransport zuständigen abgestorbenen Tracheen stehen. Ähnlich wie die Geleitzellen des Phloems kontrollieren sie den Transport verschiedener Substanzen in und aus den Tracheen des Xylems (Morris *et al.*, 2018). Zudem wurde in der genannten Studie eine Hochregulation des JrSUT1 im Xylem nach mehreren Frost- und Tauzyklen festgestellt. Aus den Ergebnissen der Lokalisations- und

Expressionsuntersuchungen des JrSUT1 der Walnuss schlossen Decourteix *et al.* (2006), dass dieser SUT am Rücktransport von Saccharose in die Tracheen nach dem Tauvorgang involviert ist. Somit wäre er an der Kontrolle des Stoffaustauschs zwischen den Parenchymzellen und den Tracheen des Xylems beteiligt. Secchi und Zwieniecki (2011) untersuchten die Auswirkung von osmotischem Stress mit verschiedenen Substanzen in *Populus trichocarpa* (dt. Westliche Balsam-Pappel) in den Tracheen des Xylems. Sie stellten in diesem Zusammenhang eine Hochregulation der Expression des Typ-I-Saccharose-Transporters PtaSUC2 im Holz bei erhöhten Saccharose-Konzentrationen fest. In zukünftigen Analysen sollte die zellspezifische Expression der mRNA oder Lokalisation des Proteins des SUT1 in *F. sylvatica* und *Q. robur* auch in Holz untersucht werden, um weitere Schlüsse über ihre Funktion im Xylem ziehen zu können.

SUTs in der weiblichen Blüte

Eine weitere Auffälligkeit in den qRT-PCR-Messungen zeigte sich in einer signifikant höheren Expression des Transporters SUT1 aus *F. sylvatica* in der weiblichen Blüte (Abbildung 4.13 A) im Vergleich zum Kalibrator Blatt. Zudem konnte die mRNA des FsSUT1 in den Samenanlagen des Fruchtknotens lokalisiert werden (Abbildung 4.19). Die Expression des SUT2 war hingegen ähnlich hoch, die Expression des SUT4 signifikant niedriger im Vergleich zum Blatt. Genau wie bei Holz handelt es sich bei Früchten um *sink*-Gewebe, welche selbst keine oder nur wenig Saccharose oder andere Kohlenhydrate produzieren und auf eine Versorgung mit diesen angewiesen sind. Saccharose-Transporter sind nicht nur an der Phloembeladung in *source*-Organen beteiligt, sondern ebenso an der Phloementladung in *sink*-Organen sowie an der Entwicklung von Pollen oder Früchten. Diese Funktionen von SUTs in den generativen Teilen von Pflanzen konnte beispielsweise in sich entwickelnden Reiskörnern (Furbank *et al.*, 2001), jungen Tomatenfrüchten (Hackel *et al.*, 2006; Shen *et al.*, 2019), Äpfeln (Peng *et al.*, 2011), Pfirsichen (Zhang *et al.*, 2013) sowie auch in den Blüten von *Arabidopsis thaliana* (Baud *et al.*, 2005; Sivitz *et al.*, 2007) gezeigt werden. In den genannten Beispielen handelte es sich bei den SUTs in Pfirsichen und Äpfeln um Typ-III-Transporter, die übrigen SUTs gehörten zum Typ I bzw. II B (bei der monokotylen Pflanze Reis). Eine hohe gewebespezifische Expression in den Samenanlagen wie bei FsSUT1 in dieser Arbeit zeigte sich auch bei dem Transporter PmSUC1 aus *Plantago major* (dt. Breitwegerich) (Gahrtz *et al.*, 1996). Ebenso wurde in dieser Studie die PmSUC1-mRNA im Rahmen der zellspezifischen Expression in den Samenanlagen lokalisiert. Eine ansteigende Expression des SISUT1 in den Samenanlagen aus *Solanum sect. Lycopersicon* (dt. Tomate) konnten Shen *et al.* (2019)

während der Befruchtung feststellen. Im Falle der untersuchten SUTs in der weiblichen Blüte aus *F. sylvatica* lassen sich speziell für den SUT1 weitere mutmaßliche Funktionen festhalten. So könnte der FsSUT1 die Beladung von Saccharose in die sich entwickelnden Samen katalysieren. Die Transporter FsSUT2 und FsSUT4 wurden zwar auch in der weiblichen Blüte exprimiert, ihre mRNA konnte jedoch nicht im Querschnitt lokalisiert werden. Daher lassen sich nur wenige Schlüsse auf ihre Funktion in der weiblichen Blüte ziehen.

Abschließend kann zusammengefasst werden, dass die SUT1, 2 und 4 in *Q. robur* und *F. sylvatica* in kleinen und hohen Bäumen gleichermaßen exprimiert werden und somit unabhängig von der Wachstumshöhe der Pflanzen die gleichen Funktionen zu erfüllen scheinen. Die zellspezifische Expression ist in dieser Arbeit für den FsSUT1 und den FsSUT2 in den vegetativen Organen Blatt und Spross gelungen. Dabei scheinen beide Transporter eine Beteiligung an der aktiven Beladung des Phloems im Blatt und an der Wiederbeladung des Transportphloems in der Sprossachse bzw. in Zweigen und Stämmen zu haben. Zudem ist der FsSUT1 mutmaßlich in die Saccharose-Beladung von sich entwickelnden weiblichen Blüten involviert. Für die SUTs aus *Q. robur* ist die zellspezifische Lokalisation ihrer mRNA im Rahmen der *in-situ*-Hybridisierung bislang nicht gelungen. Aufgrund der nahen Verwandtschaft beider Baumarten kann davon ausgegangen werden, dass die Saccharose-Transporter aus *Q. robur* ähnliche Funktionen erfüllen wie die SUTs aus *F. sylvatica*.

In zukünftigen Untersuchungen von SUTs sollte ihre Lokalisation auf Proteinebene durchgeführt werden. Die in dieser Arbeit lokalisierte mRNA liefert zwar erste Hinweise auf die Lokalisation der SUTs, jedoch konnte insbesondere bei der Lokalisation im Phloem nicht zwischen den einzelnen Zelltypen des Gewebes differenziert werden. Um weitere Kenntnisse über die Funktionen von SUTs in der aktiven Phloembeladung zu erhalten, sollte daher mithilfe von Proteinantikörpern genauer untersucht werden, ob die entsprechenden Proteine in den Geleitzellen, den Siebelementen oder in beiden Zelltypen lokalisiert sind.

5.5.3 SWEETs in *Q. robur* und *F. sylvatica*

Für *Quercus robur* konnte die vollständige cDNA des QrSWEET12 isoliert werden, in *Fagus sylvatica* wurde eine Teilsequenz dieses Transporters gefunden, welcher als FsSWEET12_EST bezeichnet wurde (Abs. 4.3.2, Abbildung 4.11). Ebenso wie die SUTs aus beiden Arten weisen die gefundenen SWEETs eine hohe Sequenzhomologie auf und clustern innerhalb der Klade III in einer Subgruppe. Insbesondere die SWEETs, die in der Klade III dieser Transporterfamilie clustern, werden u.a. mit einer Funktion in der aktiven apoplastischen Phloembeladung in Verbindung gebracht (Chen *et al.*, 2012; Breia *et al.*, 2021; Bezruczyk *et*

al., 2021). SWEETs stellen neben den SUTs die zweite Gruppe der an der apoplastischen Phloembeladung beteiligten Transporter dar. Sie sind dabei für den Austritt von Saccharose entweder direkt aus den Mesophyllzellen, aus den Bündelscheidenzellen oder Phloemparenchymzellen in den Apoplasten verantwortlich (Chen *et al.*, 2012; Eom *et al.*, 2015). Im Gegensatz zu den SUTs ist die Rolle von SWEETs in der apoplastischen Beladung des Phloems bislang weniger erforscht. Eine Beteiligung der Transporter an diesem aktiven Beladungsschritt des Phloems konnte jedoch für *Arabidopsis thaliana* für die Transporter AtSWEET11 und AtSWEET12 von Chen *et al.* (2012) sowie in der monokotylen Pflanze *Zea mays* (dt. Mais) für die Transporter SWEET13 a, b und c von Bezruczyk *et al.* (2021) bestätigt werden.

Der Nachweis putativer SWEETs in *F. sylvatica* und *Q. robur* kann einen weiteren Anhaltspunkt dafür darstellen, dass die Phloembeladung beider Baumarten auch aus aktiven Schritten besteht. Allerdings sind für den endgültigen Nachweis dafür noch zahlreiche Untersuchungen notwendig. Diese müssen u.a. die Überprüfung umfassen, ob die putativen Transporter Saccharose aufnehmen können und nicht womöglich andere Zucker als Substrat besitzen. Zudem muss die Lokalisation der Sequenzen auf mRNA sowie auf Proteinebene erfolgen. Wie in Abs. 1.4.3.3 bereits erwähnt, sind Transporter der SWEET-Familie tendenziell in einer sehr hohen Anzahl in zahlreichen Pflanzenfamilien gefunden worden. Es ist auch möglich, dass nicht bzw. nicht nur ausschließlich der SWEET12 in *F. sylvatica* und *Q. robur* in die Phloembeladung involviert ist. Ebenso ist es denkbar, dass andere Transporter dieser Familie hieran beteiligt sein könnten.

5.6 Phloembeladung in hohen *Picea abies*

5.6.1 NSC-Gehalte in *P. abies*

In *Picea abies* und anderen Koniferen ist der Mechanismus der Phloembeladung im Gegensatz zu dem in Angiospermen weniger verstanden (Liesche *et al.*, 2011; Liesche und Schulz, 2018). Die nicht-wässrige Fraktionierung (NWF) für die Trennung der Blattkompartimente kann für Nadelblätter nicht verwendet werden. Zudem ist auch das Sammeln von Phloemsaft über die Laser-Aphiden-Technik durch Blattläuse nicht möglich, da sich zwischen Leitbündel und Bündelscheide in Koniferen das Transfusionsparenchym als zusätzliche Gewebeschicht befindet. Dieses besteht sowohl aus lebenden Parenchymzellen als auch aus toten Tracheiden und stellt somit eine zusätzliche Barriere zwischen Leitbündel und Mesophyllzellen dar, wodurch das Sammeln von Phloemsaft erschwert wird (Liesche und Schulz, 2012). Die bisher vorhandenen Erkenntnisse über die Phloembeladung in Koniferen wurden hauptsächlich

anhand der Zuckerkonzentrationen in den Blättern bzw. Nadeln, der Osmolalitäten des Blattsaftes sowie anhand von Untersuchungen der Verbindungen zwischen den Zellen des *pre-phloem pathways* erzielt. Aufgrund der hohen Zuckerkonzentrationen sowie der zahlreichen Plasmodesmen wird für Koniferen ein passiver Beladungsmechanismus angenommen (Fu *et al.*, 2011; Liesche *et al.*, 2011; Liesche und Schulz, 2012).

In dieser Arbeit wurden die NSC-Gehalte sowie die anorganischen Kationen und Anionen in Nadeln, Rinde und Holz kleiner (2 m) und hoher (24 m) *P. abies* gemessen. Als Zucker konnten hierbei Glucose, Fructose und Saccharose identifiziert werden. Als Kationen und Anionen wurden hauptsächlich Kalium und Chlorid in allen untersuchten Organen gefunden (Abbildung 4.3). Insbesondere in Nadeln zeigten sich im Vergleich kleiner und hoher Bäume Unterschiede. So wurden in den Nadeln hoher Bäume jeweils signifikant geringere Zucker- und Stärkegehalte bestimmt. Ein genau umgekehrtes Ergebnis zeigten, wie bereits in Abs. 5.2 erwähnt, Woodruff und Meinzer (2011) in ihrer Studie zur NSC-Verteilung in unterschiedlichen Wachstumshöhen der Gewöhnlichen Douglasie. Diese zeigten in den sehr trockenen Sommermonaten in den Nadeln einen Anstieg des NSC-Gehaltes, der insbesondere auf den Anstieg von Stärke zurückzuführen war. Würth *et al.* (2005) zeigten in einer Studie des jahreszeitlichen Einflusses auf die NSC-Gehalte in Baumarten in tropischen Gebieten ebenfalls, dass diese in den Trockenperioden ansteigen und dieser Anstieg hauptsächlich durch höhere Stärkekonzentrationen zustande kommt. Ein Grund, aus welchem ein Anstieg des NSC-Gehaltes nicht in den beprobten hohen *P. abies* in dieser Arbeit zu beobachten war, könnten, wie auch bei den untersuchten Laubbaumarten *F. sylvatica* und *Q. robur*, die feuchteren Standortbedingungen sein. Insgesamt zeigen sich jedoch in *P. abies* ähnlich hohe Gesamtzucker- und auch ähnliche hohe Osmolalitäten des Blattsaftes wie in *F. sylvatica* und *Q. robur* (Abbildung 4.4). Diese Beobachtungen würden die Hypothese von Fu *et al.* (2011) unterstützen, nach welcher Pflanzen mit hohen Osmolalitäten im Blattsaft eher zu den passiven Phloembeladern zählen. Allerdings kann allein durch die Osmolalität keine zuverlässige Aussage über den Mechanismus der Phloembeladung getroffen werden, wie die Ergebnisse in verschiedenen Laubbaumarten gezeigt haben (Öner-Sieben und Lohaus, 2014; Döbelstein *et al.*, 2019; Gersony *et al.*, 2021). Auch in Koniferen wie *P. abies* sollte die subzelluläre Verteilung der Zucker sowie möglichst auch die Zuckerkonzentration des Phloemsaftes in zukünftigen Untersuchungen analysiert werden.

5.6.2 Expression von Saccharose-Transportern in *P. abies*

In vorherigen Untersuchungen konnten Saccharose-Transporter in *P. abies* identifiziert und ihre Expression zu verschiedenen Tageszeiten und unter jahreszeitlichen Einflüssen untersucht werden (Dobbelstein *et al.*, 2019). Dies ist zwar kein Beweis für eine aktive Phloembeladung in Koniferen, jedoch ein erster Anhaltspunkt dafür, dass SUTs auch hier an der Be- und Entladung des Phloems sowie anderen Transportprozessen beteiligt sind. Daher wurde auch in dieser Arbeit untersucht, ob SUTs in kleinen und hohen Bäumen gleichermaßen exprimiert werden. Zudem wurde die zellspezifische SUT-Expression in Nadeln und Sprossachsen untersucht, um weitere Rückschlüsse auf ihre Funktion im Phloem und somit an ihrer Beteiligung am Zuckertransport in Pflanzen zu ziehen.

Wie bei den beiden Laubbaumarten wurde die Expression der Saccharose-Transporter PaSUT1 und PaSUT2 aus *Picea abies* analysiert. Im Vergleich zwischen der Expression in kleinen und hohen Bäumen (Abbildung 4.14) zeigte sich nur in Holz hoher Bäume eine signifikant niedrigere Expression des PaSUT1. Auch im organspezifischen Vergleich (Abbildung 4.15), in welcher die Expression in Nadeln mit den Werten in *sink*-Nadeln (junge, einjährige Nadeln), Rinde und Holz verglichen wurde, zeigten sowohl der SUT1 als auch der SUT2 eine gleichbleibende Expression in allen Organen verglichen mit dem Kalibrator. Lediglich im Holz kleiner Bäume wurde eine signifikant höhere Expression des SUT1 im Vergleich zu Nadeln gemessen. Eine erhöhte Expression in Holz könnte ein Hinweis darauf sein, dass der SUT1 auch in *Picea abies* an Transportprozessen im Xylem beteiligt sein könnte, wie es auch schon in den beiden untersuchten Laubbäumen *F. sylvatica* und *Q. robur* vermutet wurde (Abschnitt 5.5.2). In einer Studie über Saccharose-Transporter und Phloembeladung in der Gymnosperme *Cedrus deodara* (dt. Himalaya-Zeder) konnten Han *et al.* (2022) den CdSUT1 in den Kambiumzellen lokalisieren und vermuteten daher eine Funktion des SUTs in der Phloem- und Xylem-Entwicklung. Zudem stellten sie die Hypothese auf, dass der SUT1 an der Versorgung der Kambiumzellen mit Saccharose beteiligt ist, wenn die Zufuhr von Saccharose ins Phloem reduziert ist.

Die Expression des SUT2 war in den jungen *sink*-Nadeln hoher Bäume signifikant höher im Vergleich zum Kalibrator. Im Rahmen der *in-situ*-Hybridisierung konnte die RNA des PaSUT2 zudem im Zentralzylinder junger Nadeln lokalisiert werden (Abbildung 4.21). Dies kann ein Hinweis darauf sein, dass der SUT2 in der Entwicklung des Leitbündels eine Rolle spielt. Im Querschnitt der einjährigen Sprossachse wurden sowohl der PaSUT1 als auch der PaSUT2 im Phloem exprimiert, der PaSUT2 zeigte zudem eine Expression im Rindenparenchym

(Abbildung 4.22). Diese Ergebnisse deuten ebenfalls darauf hin, dass beide SUTs in Transportprozesse im Leitbündel involviert sind und unterstützen eine weitere Hypothese von Han *et al.* (2022), dass SUTs in Gymnospermen ähnliche Funktionen erfüllen wie die Transporter in Angiospermen.

In der zellspezifischen Expression konnte zudem sowohl die mRNA des PaSUT1 als auch des PaSUT2 in zweijährigen Nadeln im Phloem lokalisiert werden (Abbildung 4.20). Darüber hinaus zeigte sich die Expression des PaSUT2 in zweijährigen Nadeln auch in einzelnen Zellen des Transfusionsparenchyms (Abbildung 4.20 C). Somit könnten die beiden SUTs auch an der Phloembeladung sowie am Transport von Saccharose, d.h. am *pre-phloem-pathway*, beteiligt sein.

Für die SUTs in *Picea abies* lässt sich abschließend zusammenfassen, dass sie ähnliche Funktionen zu erfüllen scheinen, wie die SUTs der beiden Angiospermen *F. sylvatica* und *Q. robur*. Im Gegensatz zu den SUTs der beiden untersuchten Laubbäume ist jedoch die Charakterisierung der Transporter (Abs. 5.5.1) aus *P. abies* noch nicht gelungen. Die Expression der Transporter in Hefe, wie sie für die SUTs aus *F. sylvatica* und *Q. robur* durchgeführt wurde, war auch nach mehreren Versuchen nicht erfolgreich (Fink, 2019). Somit ist unklar, ob die SUTs funktional sind und Saccharose transportieren können und wie hoch in diesem Fall die Affinität zu Saccharose ist. In ihrer Arbeit über die Koniferen-SUTs aus *Cedrus deodara* und *Pinus massionata* verwendeten Han *et al.* (2022) an Stelle von Hefezellen Blattzellen aus Tabak (lat. *N. tabacum*) als Expressionssystem für die Saccharose-Transporter der genannten Baumarten. Für die Überprüfung der Funktionalität der SUTs wurde das fluoreszierende Cumarin- β -Glucosid Esculin als Substrat verwendet. Dieses hat sich als Saccharose-Analogon für Aufnahmetests von SUTs in Hefen oder pflanzlichen Protoplasten sehr gut etabliert (Gora *et al.*, 2012; Reinders *et al.*, 2012b; Rottmann *et al.*, 2018; Garg *et al.*, 2022). Für die SUTs der beiden von Han *et al.* (2022) untersuchten Koniferen konnte eine Aufnahme von Esculin in den mit den entsprechenden SUT-Vektoren transformierten Tabakepidermis-Zellen festgestellt werden. Hierbei zeigte der SUT1 jeweils höhere Transportraten als der SUT2. In zukünftigen Untersuchungen zu SUTs aus *P. abies* könnten Tabakblätter oder Protoplasten (Rottmann *et al.*, 2018) ebenfalls als Expressionssystem für die Transporter verwendet werden.

6. Fazit

In dieser Arbeit sollte der Mechanismus der Phloembeladung in den Laubbaumarten *Fagus sylvatica* und *Quercus robur* sowie in der Konifere *Picea abies* untersucht werden. Erstmals wurde dabei dieser Mechanismus an hohen Bäumen, welche Höhen zwischen 13 und 30 m aufwiesen, untersucht.

Bei den beiden Laubbaumarten konnte im Rahmen der vorliegenden Studie gezeigt werden, dass die Phloembeladung wahrscheinlich aktive Schritte enthält. Diese Schlussfolgerung konnte durch einen aufsteigenden Gradienten der Saccharose-Konzentrationen im Zytosol der Mesophyllzellen sowie im Phloemsaft, der aus kleinen Bäumen gewonnen wurde, gezogen werden. Weiterhin konnte in beiden Arten gezeigt werden, dass Saccharose-Transporter (SUTs) in hohen Bäumen in den Geweben Blatt, Rinde und Holz exprimiert werden und sich die Expression auf einem ähnlichen Niveau befindet wie in kleinen, jungen Bäumen. Die SUTs der Typen I, II und III wurden hinsichtlich ihrer Funktionalität analysiert, wobei für alle Transporter gezeigt werden konnte, dass sie Saccharose durch die Zellmembran transportieren können. Der Nachweis der mRNA des FsSUT1 und des FsSUT2 im Phloem in Blättern und Rinde von *F. sylvatica* stützt die Hypothese, dass SUTs sowohl an der Beladung des Phloems mit Saccharose als auch am Rücktransport von Saccharose ins Transportphloem beteiligt sind. Darüber hinaus zeigte der Nachweis der mRNA des FsSUT1 in der weiblichen Blüte, dass auch eine Funktion von SUTs in der Phloementladung angenommen werden kann. Für die SUTs aus *Q. robur* ist der zellspezifische Nachweis der mRNA nicht gelungen. Es ist jedoch naheliegend, dass sie aufgrund der engen phylogenetischen Verwandtschaft zu *F. sylvatica* in denselben Geweben bzw. Zelltypen exprimiert werden.

In zukünftigen Untersuchungen sollte für eine endgültige Bestätigung einer aktiven Phloembeladung in *F. sylvatica* und *Q. robur* auch der Phloemsaft in den Blättern hoher Bäume untersucht werden. Dabei stellt die große Höhe älterer Bäume eine Herausforderung und eine Limitierung für die Anwendung der bei kleinen Bäumen angewandten Laser-Aphiden Technik dar. Eine vielversprechende Möglichkeit, den Phloemsaft in Blättern hoher Bäume zu untersuchen, stellten Gersony *et. al* (2021) mit der Anwendung der Raman-Spektroskopie vor. Diese könnte auch in zukünftigen Studien mit *F. sylvatica* und *Q. robur* angewendet werden. Weiterhin ist es sinnvoll, die Lokalisation der SUTs auch auf Proteinebene zu untersuchen. Insbesondere für den SUT4 beider Baumarten sollte die Lokalisation intrazellulär in pflanzlichen Protoplasten analysiert werden. Für diesen SUT-Typen ist aus vorherigen Studien

eine Lokalisation in der pflanzlichen Vakuole wahrscheinlich. Dies konnte für *F. sylvatica* und *Q. robur* bislang nicht bestätigt werden.

Bei *Picea abies* sind im Gegensatz zu den beiden untersuchten Laubbaumarten mehr offene Fragen hinsichtlich der Phloembeladung vorhanden. Als Ergebnisse dieser Studie können zusammengefasst werden, dass die Zucker- und Stärkegehalte in hohen Bäumen und kleinen Bäumen auf einem ähnlichen Niveau liegen. Zudem sind Saccharose-Transporter in allen untersuchten Organen in beiden Wachstumshöhen gleichermaßen exprimiert. Es ist daher möglich, dass das Phloem in kleinen und hohen Bäumen über den gleichen Mechanismus beladen wird. Die Frage, ob es aktive Schritte in der Phloembeladung auch bei *P. abies* gibt, lässt sich abschließend nicht sicher beantworten. Hinweise darauf, dass SUTs in die Phloembeladung involviert sind, liefert die zellspezifische Expression des SUT1 und SUT2 im Phloem der Nadelblätter sowie der Sprossachse. Allerdings ist die Funktionalität der putativen SUTs aus *P. abies* hinsichtlich ihrer Fähigkeit, Saccharose aufzunehmen, bislang nicht bekannt. Zudem können Aussagen darüber, wie hoch die Saccharose-Konzentration im Phloemsaft im Vergleich zum Zytosol der Mesophyllzellen ist, nicht getroffen werden. Zukünftige Untersuchungen sollten somit den Fokus insbesondere auf die Beantwortung der Frage legen, ob es einen Konzentrationsgradienten von Saccharose zwischen Phloemsaft und Mesophyllzellen gibt.

Sowohl in den Laubbaumarten als auch in der untersuchten Konifere sollte künftig auch die Transporterfamilie der SWEETs in die Untersuchung der Phloembeladung einbezogen und das Zusammenspiel zwischen SUTs und SWEETs genauer betrachtet werden.

Literaturverzeichnis

Adkins S, Burmeister M. 1996. Visualization of DNA in agarose gels as migrating colored bands: applications for preparative gels and educational demonstrations. *Analytical biochemistry* **240**, 17–23.

Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA et al. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic acids research* **25**, 3389–3402.

Aoki N, Hirose T, Scofield GN, Whitfeld PR, Furbank RT. 2003. The sucrose transporter gene family in rice. *Plant & cell physiology* **44**, 223–232.

Aoki N, Scofield GN, Wang X-D, Patrick JW, Offler CE, Furbank RT. 2004. Expression and localisation analysis of the wheat sucrose transporter TaSUT1 in vegetative tissues. *Planta* **219**, 176–184.

Barker L, Kühn C, Weise A et al. 2000. SUT2, a putative sucrose sensor in sieve elements. *The Plant cell* **12**, 1153–1164.

Barlow CA, McCully ME. 1972. The ruby laser as an instrument for cutting the stylets of feeding aphids. *Canadian Journal of Zoology* **50**, 1497–1498.

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.

Baud S, Wuillème S, Lemoine R et al. 2005. The AtSUC5 sucrose transporter specifically expressed in the endosperm is involved in early seed development in *Arabidopsis*. *The Plant journal for cell and molecular biology* **43**, 824–836.

Benson DA, Cavanaugh M, Clark K et al. 2013. GenBank. *Nucleic acids research* **41**, D36–42.

Bermejo-Barrera P, Fernández-Nocelo S, Moreda-Piñeiro A, Bermejo-Barrera A. 1999. Usefulness of enzymatic hydrolysis procedures based on the use of pronase E as sample pre-treatment for multi-element determination in biological materials. *J. Anal. At. Spectrom.* **14**, 1893–1900.

Berthier A, Meuriot F, Dédaldéchamp F, Lemoine R, Prud'homme M-P, Noiraud-Romy N. 2014. Identification of a new sucrose transporter in rye-grass (LpSUT2): effect of defoliation and putative fructose sensing. *Plant physiology and biochemistry PPB* **84**, 32–44.

- Bezruczyk M, Zöllner NR, Kruse CPS et al.** 2021. Evidence for phloem loading via the abaxial bundle sheath cells in maize leaves. *The Plant cell* **33**, 531–547.
- Boden S, Kahle H-P, Wilpert K von, Spiecker H.** 2014. Resilience of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst) growth to changing climatic conditions in Southwest Germany. *Forest Ecology and Management* **315**, 12–21.
- Boer AH de, Volkov V.** 2003. Logistics of water and salt transport through the plant: structure and functioning of the xylem. *Plant, cell & environment* **26**, 87–101.
- Bolte A, Czajkowski T, Kompa T.** 2007. The north-eastern distribution range of European beech a review. *Forestry* **80**, 413–429.
- Bond BJ, Czarnomski NM, Cooper C, Day ME, Greenwood MS.** 2007. Developmental decline in height growth in Douglas-fir. *Tree physiology* **27**, 441–453.
- Braun DM, Wang L, Ruan Y-L.** 2014. Understanding and manipulating sucrose phloem loading, unloading, metabolism, and signalling to enhance crop yield and food security. *Journal of experimental botany* **65**, 1713–1735.
- Breia R, Conde A, Badim H, Fortes AM, Gerós H, Granell A.** 2021. Plant SWEETs: from sugar transport to plant-pathogen interaction and more unexpected physiological roles. *Plant physiology* **186**, 836–852.
- Brennan M, Fritsch C, Cosgun S, Dumarcay S, Colin F, Gérardin P.** 2020. Quantitative and qualitative composition of bark polyphenols changes longitudinally with bark maturity in *Abies alba* Mill. *Annals of Forest Science* **77:9**.
- Bucci SJ, Scholz FG, Goldstein G, Meinzer FC, Da Sternberg LSL.** 2003. Dynamic changes in hydraulic conductivity in petioles of two savanna tree species: factors and mechanisms contributing to the refilling of embolized vessels. *Plant, cell & environment* **26**, 1633–1645.
- Canny MJ.** 1993. Transfusion tissue of pine needles as a site of retrieval of solutes from the transpiration stream. *The New phytologist* **123**, 227–232.
- Chang S, Puryear J, Cairney J.** 1993. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Molecular Biology Reporter* **11**, 113–116.
- Chen L-Q.** 2014. SWEET sugar transporters for phloem transport and pathogen nutrition. *The New phytologist* **201**, 1150–1155.

- Chen L-Q, Hou B-H, Lalonde S et al.** 2010. Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens. *Nature* **468**, 527–532.
- Chen L-Q, Qu X-Q, Hou B-H et al.** 2012. Sucrose efflux mediated by SWEET proteins as a key step for phloem transport. *Science (New York, N.Y.)* **335**, 207–211.
- Chincinska IA, Liesche J, Krügel U et al.** 2008. Sucrose transporter StSUT4 from potato affects flowering, tuberization, and shade avoidance response. *Plant physiology* **146**, 515–528.
- Christenhusz MJ, Byng JW.** 2016. The number of known plants species in the world and its annual increase. *Phytotaxa* **261**, 201.
- Crane PR, Friis EM, Pedersen KR.** 1995. The origin and early diversification of angiosperms. *Nature* **374**, 27–33.
- Decourteix M, Alves G, Brunel N et al.** 2006. JrSUT1, a putative xylem sucrose transporter, could mediate sucrose influx into xylem parenchyma cells and be up-regulated by freeze-thaw cycles over the autumn-winter period in walnut tree (*Juglans regia* L.). *Plant, cell & environment* **29**, 36–47.
- Del Martinez Castillo E, Zang CS, Buras A et al.** 2022. Climate-change-driven growth decline of European beech forests. *Communications biology* **5**, 163.
- Deng W, Nickle DC, Learn GH, Maust B, Mullins JI.** 2007. ViroBLAST: a stand-alone BLAST web server for flexible queries of multiple databases and user's datasets. *Bioinformatics (Oxford, England)* **23**, 2334–2336.
- DeSchepper V, Swaef T de, Bauweraerts I, Steppe K.** 2013. Phloem transport: a review of mechanisms and controls. *Journal of experimental botany* **64**, 4839–4850.
- Dheda K, Huggett JF, Bustin SA, Johnson MA, Rook G, Zumla A.** 2004. Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. *BioTechniques* **37**, 112–4, 116, 118–9.
- Dobbelstein E.** 2019. Zuckertransport und Phloembeladung in Fagaceae und Salicaceae. Dissertation. Universitätsbibliothek der Bergischen Universität Wuppertal, Wuppertal.
- Dobbelstein E, Fink D, Öner-Sieben S, Czempik L, Lohaus G.** 2019. Seasonal changes of sucrose transporter expression and sugar partitioning in common European tree species. *Tree physiology* **39**, 284–299.

- Dotzauer D, Wolfenstetter S, Eibert D, Schneider S, Dietrich P, Sauer N.** 2010. Novel PSI domains in plant and animal H⁺-inositol symporters. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* **11**, 767–781.
- Edward Eaton, Giovanni Caudullo, Sandra Oliveira, Daniele de Rigo.** op. 2016. *Quercus robur* and *Quercus petraea* in Europe: distribution, habitat, usage and threats. In: San Miguel-Ayanz J (Ed.) *European atlas of forest tree species*. Luxemburgo: Unión Europea.
- Emr SD, Schekman R, Flessel MC, 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* **80**, 7080–7084.
- Endler A, Meyer S, Schelbert S et al.** 2006. Identification of a vacuolar sucrose transporter in barley and Arabidopsis mesophyll cells by a tonoplast proteomic approach. *Plant physiology* **141**, 196–207.
- Eom J-S, Chen L-Q, Sosso D et al.** 2015. SWEETs, transporters for intracellular and intercellular sugar translocation. *Current opinion in plant biology* **25**, 53–62.
- Evert RF.** 2009. *Esau Pflanzenanatomie: Meristeme, Zellen und Gewebe der Pflanzen - ihre Struktur, Funktion und Entwicklung*. Berlin/Boston: De Gruyter-Verlag.
- Falchi R, Bonghi C, Drincovich MF et al.** 2020. Sugar Metabolism in Stone Fruit: Source-Sink Relationships and Environmental and Agronomical Effects. *Frontiers in plant science* **11**, 573982.
- Farjon A.** 2017. *Picea abies*. *IUCN Red List of Threatened Species*.
- Fink D.** 2019. Phloembeladung und Zuckertransport in ausgewählten Gymnospermen. Dissertation. Universitätsbibliothek der Bergischen Universität Wuppertal, Wuppertal.
- Fink D, Dobbstein 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.
- Fisher DB, Frame JM.** 1984. A guide to the use of the exuding-styilet technique in phloem physiology. *Planta* **161**, 385–393.

- Franceschi VR, Krokene P, Krekling T, Christiansen E.** 2000. Phloem parenchyma cells are involved in local and distant defense responses to fungal inoculation or bark-beetle attack in Norway spruce (Pinaceae). *American journal of botany* **87**, 314–326.
- Freeling M, Walbot V.** 1994. *The Maize handbook*. New York: Springer-Verlag.
- Freeman WM, Walker SJ, Vrana KE.** 1999. Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. *BioTechniques* **26**, 112–22, 124–5.
- Frost CJ, Nyamdari B, Tsai C-J, Harding SA.** 2012. The tonoplast-localized sucrose transporter in *Populus* (PtaSUT4) regulates whole-plant water relations, responses to water stress, and photosynthesis. *PloS one* **7**, e44467.
- Fu Q, Cheng L, Guo Y, Turgeon R.** 2011. Phloem loading strategies and water relations in trees and herbaceous plants. *Plant physiology* **157**, 1518–1527.
- Furbank RT, Scofield GN, Hirose T, Wang X-D, Patrick JW, Offler CE.** 2001. Cellular localisation and function of a sucrose transporter OsSUT1 in developing rice grains. *Functional Plant Biology* **28**, 1187.
- Gahrtz M, Schmelzer E, Stolz J, Sauer N.** 1996. Expression of the PmSUC1 sucrose carrier gene from *Plantago major* L. is induced during seed development. *The Plant journal for cell and molecular biology* **9**, 93–100.
- Gahrtz M, Stolz J, Sauer N.** 1994. A phloem-specific sucrose-H⁺ symporter from *Plantago major* L. supports the model of apoplastic phloem loading. *The Plant journal for cell and molecular biology* **6**, 697–706.
- Gamalei Y.** 1989. Structure and function of leaf minor veins in trees and herbs. *Trees* **3**, 96–110.
- Garg V, Reins J, Hackel A, Kühn C.** 2022. Elucidation of the interactome of the sucrose transporter StSUT4: sucrose transport is connected to ethylene and calcium signalling. *Journal of experimental botany* **73**, 7401–7416.
- Geiger D.** 2011. Plant sucrose transporters from a biophysical point of view. *Molecular plant* **4**, 395–406.
- Gersony JT, McClelland A, Holbrook NM.** 2021. Raman spectroscopy reveals high phloem sugar content in leaves of canopy red oak trees. *The New phytologist* **232**, 418–424.

Gebler A, Keitel C, Kreuzwieser J, Matyssek R, Seiler W, Rennenberg H. 2006. Potential risks for European beech (*Fagus sylvatica* L.) in a changing climate. *Trees* **21**, 1–11.

Getz HP, Klein M. 1995. Characteristics of Sucrose Transport and Sucrose-Induced H⁺ Transport on the Tonoplast of Red Beet (*Beta vulgaris* L.) Storage Tissue. *Plant physiology* **107**, 459–467.

Goggin FL, Medville R, Turgeon R. 2001. Phloem loading in the tulip tree. Mechanisms and evolutionary implications. *Plant physiology* **125**, 891–899.

Gomez B, Daviero-Gomez V, Coiffard C, Martín-Closas C, Dilcher DL. 2015. Montsechia, an ancient aquatic angiosperm. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **112**, 10985–10988.

Goodstein DM, Shu S, Howson R et al. 2012. Phytozome: a comparative platform for green plant genomics. *Nucleic acids research* **40**, D1178–86.

Gora PJ, Reinders A, Ward JM. 2012. A novel fluorescent assay for sucrose transporters. *Plant methods* **8**, 13.

Göttlinger T, Lohaus G. 2022. Comparative analyses of the metabolite and ion concentrations in nectar, nectaries, and leaves of 36 bromeliads with different photosynthesis and pollinator types. *Frontiers in plant science* **13:987145**.

Göttlinger T, Schwerdtfeger M, Tiedge K, Lohaus G. 2019. What Do Nectarivorous Bats Like? Nectar Composition in Bromeliaceae With Special Emphasis on Bat-Pollinated Species. *Frontiers in plant science* **10:205**.

Gottwald JR, Krysan PJ, Young JC, Evert RF, Sussman MR. 2000. Genetic evidence for the in planta role of phloem-specific plasma membrane sucrose transporters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 13979–13984.

Gould N, Thorpe MR, Pritchard J et al. 2012. AtSUC2 has a role for sucrose retrieval along the phloem pathway: evidence from carbon-11 tracer studies. *Plant science an international journal of experimental plant biology* **188-189**, 97–101.

Hacke UG, Sperry JS, Pittermann J. 2005. Efficiency Versus Safety Tradeoffs for Water Conduction in Angiosperm Vessels Versus Gymnosperm Tracheids. In: *Vascular Transport in Plants*: Elsevier, 333–353.

- Hackel A, Schauer N, Carrari F, Fernie AR, Grimm B, Kühn C.** 2006. Sucrose transporter LeSUT1 and LeSUT2 inhibition affects tomato fruit development in different ways. *The Plant journal for cell and molecular biology* **45**, 180–192.
- Hall TA.** 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 95–98.
- Hallgren J, Tsirigos KD, Pedersen MD et al.** 2022. DeepTMHMM predicts alpha and beta transmembrane proteins using deep neural networks. *preprint* from bioRxiv; 2022
- Han X, Gao C, Liang B et al.** 2022. Evidence for conifer sucrose transporters' functioning in the light-dependent adjustment of sugar allocation. *Tree physiology* **42**, 488–500.
- Hanahan D.** 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology* **166**, 557–580.
- 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.
- Hartmann H, Trumbore S.** 2016. Understanding the roles of nonstructural carbohydrates in forest trees - from what we can measure to what we want to know. *The New phytologist* **211**, 386–403.
- Hedrich R, Sauer N, Neuhaus HE.** 2015. Sugar transport across the plant vacuolar membrane: nature and regulation of carrier proteins. *Current opinion in plant biology* **25**, 63–70.
- Heineke D, Wildenberger K, Sonnewald U, Willmitzer L, Heldt H.** 1994. Accumulation of hexoses in leaf vacuoles: Studies with transgenic tobacco plants expressing yeast-derived invertase in the cytosol, vacuole or apoplast. *Planta* **194**, 29–33.
- Henry C, Rabot A, Laloi M et al.** 2011. Regulation of RhSUC2, a sucrose transporter, is correlated with the light control of bud burst in *Rosa* sp. *Plant, cell & environment* **34**, 1776–1789.
- Ho L-H, Lee Y-I, Hsieh S-Y et al.** 2021. GeSUT4 mediates sucrose import at the symbiotic interface for carbon allocation of heterotrophic *Gastrodia elata* (Orchidaceae). *Plant, cell & environment* **44**, 20–33.
- Hohagen J, Herlitz I, Jackson DJ.** 2015. An optimised whole mount in situ hybridisation protocol for the mollusc *Lymnaea stagnalis*. *BMC developmental biology* **15**, 19.

- Houkpe BW, Chenou F, Lima F de, Paula EV de.** 2021. HRT Atlas v1.0 database: redefining human and mouse housekeeping genes and candidate reference transcripts by mining massive RNA-seq datasets. *Nucleic acids research* **49**, D947-D955.
- Jackson D.** 1992. In situ hybridization in plants. *Molecular Plant Pathology: A Practical Approach.*, 163–174.
- Javelle M, Marco CF, Timmermans M.** 2011. In situ hybridization for the precise localization of transcripts in plants. *Journal of visualized experiments JoVE*, (57):e3328.
- Karlgren A, Carlsson J, Gyllenstrand N, Lagercrantz U, Sundström JF.** 2009. Non-radioactive in situ hybridization protocol applicable for Norway spruce and a range of plant species. *Journal of visualized experiments JoVE*, (26):1205.
- 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.** 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, 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.
- Koenen M, Rüther U, Müller-Hill B.** 1982. Immunoenzymatic detection of expressed gene fragments cloned in the lac Z gene of *E. coli*. *The EMBO journal* **1**, 509–512.
- Krogh A, Larsson B, Heijne G von, Sonnhammer EL.** 2001. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *Journal of Molecular Biology* **305**, 567–580.
- Kück U, Wolff G.** 2014. Botanisches Grundpraktikum. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.
- 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 (New York, N.Y.)* **275**, 1298–1300.
- Kühn C, Grof CPL.** 2010. Sucrose transporters of higher plants. *Current opinion in plant biology* **13**, 288–298.
- Lalonde S, Frommer WB.** 2012. SUT Sucrose and MST Monosaccharide Transporter Inventory of the Selaginella Genome. *Frontiers in plant science* **3**, 24.

- Lauterbach C, Niedermeier M, Besenbeck R, Stadler R, Sauer N.** 2007. Immunolocalization of the PmSUC1 sucrose transporter in *Plantago major* flowers and reporter-gene analyses of the PmSUC1 promoter suggest a role in sucrose release from the inner integument. *Plant biology* **9**, 357–365.
- Leidreiter K, Kruse A, Heineke D, Robinson DG, Heldt H-W.** 1995. Subcellular Volumes and Metabolite Concentrations in Potato (*Solanum tuberosum* cv. Désirée) Leaves 1. *Botanica Acta* **108**, 439–444.
- Lemoine R.** 2000. Sucrose transporters in plants: update on function and structure. *Biochimica et biophysica acta* **1465**, 246–262.
- Lemoine R, La Camera S, Atanassova R et al.** 2013. Source-to-sink transport of sugar and regulation by environmental factors. *Frontiers in plant science* **4**, 272.
- Leuschner C.** 2020. Drought response of European beech (*Fagus sylvatica* L.)—A review. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* **47**, 125576.
- Levine M.** 2011. Photosynthesis and Sucrose Production. In: Levine M (Ed.) *Topics in Dental Biochemistry*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 17–27.
- Li Y-T.** 1967. Studies on the Glycosidases in Jack Bean Meal. *Journal of Biological Chemistry* **242**, 5474–5480.
- Liesche J.** 2017. Sucrose transporters and plasmodesmal regulation in passive phloem loading. *Journal of integrative plant biology* **59**, 311–321.
- Liesche J, Gao C, Binczycki P et al.** 2019. Direct Comparison of Leaf Plasmodesma Structure and Function in Relation to Phloem-Loading Type. *Plant physiology* **179**, 1768–1778.
- Liesche J, Martens HJ, Schulz A.** 2011. Symplasmic transport and phloem loading in gymnosperm leaves. *Protoplasma* **248**, 181–190.
- Liesche J, Patrick J.** 2017. An update on phloem transport: a simple bulk flow under complex regulation. *F1000Research* **6**, 2096.
- Liesche J, Schulz A.** 2012. In vivo quantification of cell coupling in plants with different phloem-loading strategies. *Plant physiology* **159**, 355–365.
- Liesche J, Schulz A.** 2013. Symplasmic Transport in Phloem Loading and Unloading. In: Sokołowska K, Sowiński P (Eds.) *Symplasmic Transport in Vascular Plants*. New York, NY: Springer-Verlag, 133–163.

- Liesche J, Schulz A.** 2018. Phloem transport in gymnosperms: a question of pressure and resistance. *Current opinion in plant biology* **43**, 36–42.
- Lintunen A, Paljakka T, Jyske T et al.** 2016. Osmolality and Non-Structural Carbohydrate Composition in the Secondary Phloem of Trees across a Latitudinal Gradient in Europe. *Frontiers in plant science* **7**, 726.
- Lohaus G.** 2019. Measurement of Subcellular Metabolite Concentrations in Relation to Phloem Loading. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **2014**, 235–251.
- Lohaus G, Schwerdtfeger M.** 2014. Comparison of sugars, iridoid glycosides and amino acids in nectar and phloem sap of *Maurandya barclayana*, *Lophospermum erubescens*, and *Brassica napus*. *PloS one* **9**, e87689.
- Lohaus G, Winter H, Riens B, Heldt HW.** 1995. Further Studies of the Phloem Loading Process in Leaves of Barley and Spinach. The Comparison of Metabolite Concentrations in the Apoplastic Compartment with those in the Cytosolic Compartment and in the Sieve Tubes 1. *Botanica Acta* **108**, 270–275.
- Lü J, Sui X, Ma S, Li X, Liu H, Zhang Z.** 2017. Suppression of cucumber stachyose synthase gene (CsSTS) inhibits phloem loading and reduces low temperature stress tolerance. *Plant molecular biology* **95**, 1–15.
- Lucas WJ, Groover A, Lichtenberger R et al.** 2013. The plant vascular system: evolution, development and functions. *Journal of integrative plant biology* **55**, 294–388.
- Ma Q-J, Sun M-H, Liu Y-J, Lu J, Hu D-G, Hao Y-J.** 2016. Molecular cloning and functional characterization of the apple sucrose transporter gene MdSUT2. *Plant physiology and biochemistry PPB* **109**, 442–451.
- Manos PS, Zhou Z-K, Cannon CH.** 2001. Systematics of Fagaceae: Phylogenetic Tests of Reproductive Trait Evolution. *International Journal of Plant Sciences* **162**, 1361–1379.
- Marshall OJ.** 2004. PerlPrimer: cross-platform, graphical primer design for standard, bisulphite and real-time PCR. *Bioinformatics (Oxford, England)* **20**, 2471–2472.
- Matsukura C, Saitoh T, Hirose T, Ohsugi R, Perata P, Yamaguchi J.** 2000. Sugar uptake and transport in rice embryo. Expression of companion cell-specific sucrose transporter (OsSUT1) induced by sugar and light. *Plant physiology* **124**, 85–93.

- McCubbin TJ, Braun DM.** 2020. Unraveling the puzzle of phloem parenchyma transfer cell wall ingrowth. *Journal of experimental botany* **71**, 4617–4620.
- McCulloh KA, Sperry JS, Adler FR.** 2003. Water transport in plants obeys Murray's law. *Nature* **421**, 939–942.
- McGadey J.** 1970. A tetrazolium method for non-specific alkaline phosphatase. *Histochemie* **23**, 180–184.
- Meyer S, Melzer M, Truernit E et al.** 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 for cell and molecular biology* **24**, 869–882.
- Miehe W, Czempik L, Klebl F, Lohaus G.** 2023. Sugar concentrations and expression of SUTs suggest active phloem loading in tall trees of *Fagus sylvatica* and *Quercus robur*. *Tree physiology* **43**, 805–816.
- Miras M, Pottier M, Schladt TM et al.** 2022. Plasmodesmata and their role in assimilate translocation. *Journal of plant physiology* **270**, 153633.
- Mishra B, Gupta DK, Pfenninger M et al.** 2018. A reference genome of the European beech (*Fagus sylvatica* L.). *GigaScience* **7**, giy063.
- Morris H, Plavcová L, Gorai M et al.** 2018. Vessel-associated cells in angiosperm xylem: Highly specialized living cells at the symplast-apoplast boundary. *American journal of botany* **105**, 151–160.
- Mulisch M, Welsch U, Aesch E, Romeis B.** 2015. Romeis-Mikroskopische Technik, 19. Aufl. Berlin: Springer Spektrum-Verlag.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H.** 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* **51 Pt 1**, 263–273.
- Münch E.** 1930. Die Stoffbewegung der Pflanze. Jena: Gustav Fischer Verlag.
- Nabors MW, Scheibe R.** 2009. Botanik. 1. Aufl. München, Boston: Pearson Studium.
- 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.

- Narváez-Vásquez J, Ryan CA.** 2004. The cellular localization of prosystemin: a functional role for phloem parenchyma in systemic wound signaling. *Planta* **218**, 360–369.
- Nikinmaa E, Sievänen R, Hölttä T.** 2014. Dynamics of leaf gas exchange, xylem and phloem transport, water potential and carbohydrate concentration in a realistic 3-D model tree crown. *Annals of botany* **114**, 653–666.
- Nobel PS.** 2009. *Physicochemical and Environmental Plant Physiology*: 4th Edition, Elsevier.
- Nolan T, Hands RE, Bustin SA.** 2006. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nature protocols* **1**, 1559–1582.
- Novaes E, Kirst M, Chiang V, Winter-Sederoff H, Sederoff R.** 2010. Lignin and biomass: a negative correlation for wood formation and lignin content in trees. *Plant physiology* **154**, 555–561.
- Nystedt B, Street NR, Wetterbom A et al.** 2013. The Norway spruce genome sequence and conifer genome evolution. *Nature* **497**, 579–584.
- Ochoa-Fernandez R, Samodelov SL, Brandl SM et al.** 2016. Optogenetics in Plants: Red/Far-Red Light Control of Gene Expression. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **1408**, 125–139.
- Omasits U, Ahrens CH, Müller S, Wollscheid B.** 2014. Protter: interactive protein feature visualization and integration with experimental proteomic data. *Bioinformatics (Oxford, England)* **30**, 884–886.
- Öner-Sieben S, Lohaus G.** 2014. Apoplastic and symplastic phloem loading in *Quercus robur* and *Fraxinus excelsior*. *Journal of experimental botany* **65**, 1905–1916.
- Öner-Sieben S.** 2014. Untersuchungen zu Phloembeladungsmechanismen bei Laubbäumen am Beispiel von *Quercus robur* und *Fraxinus excelsior*. Dissertation. Universitätsbibliothek der Bergischen Universität Wuppertal, Wuppertal.
- 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.
- Palovaara J, Hakman I.** 2008. Conifer WOX-related homeodomain transcription factors, developmental consideration and expression dynamic of WOX2 during *Picea abies* somatic embryogenesis. *Plant molecular biology* **66**, 533–549.

- Paysan-Lafosse T, Blum M, Chuguransky S et al.** 2023. InterPro in 2022. *Nucleic acids research* **51**, D418-D427.
- Payyavula RS, Tay KHC, Tsai C-J, Harding SA.** 2011. The sucrose transporter family in *Populus*: the importance of a tonoplast PtaSUT4 to biomass and carbon partitioning. *The Plant journal for cell and molecular biology* **65**, 757–770.
- Peng C-C, Xu Y-H, Xi R-C, Zhao X-L.** 2011. Expression, subcellular localization and phytohormone stimulation of a functional sucrose transporter (MdSUT1) in apple fruit. *Scientia Horticulturae* **128**, 206–212.
- Peng D, Gu X, Xue L-J, Leebens-Mack JH, Tsai C-J.** 2014. Bayesian phylogeny of sucrose transporters: ancient origins, differential expansion and convergent evolution in monocots and dicots. *Frontiers in plant science* **5**, 615.
- Pfaffl MW.** 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research* **29**, e45.
- Plavcová L, Hoch G, Morris H, Ghiasi S, Jansen S.** 2016. The amount of parenchyma and living fibers affects storage of nonstructural carbohydrates in young stems and roots of temperate trees. *American journal of botany* **103**, 603–612.
- Rasheed-Depardieu C, Parent C, Crèvecoeur M et al.** 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.
- Rasouli M.** 2016. Basic concepts and practical equations on osmolality: Biochemical approach. *Clinical biochemistry* **49**, 936–941.
- Reidel EJ, Rennie EA, Amiard V, Cheng L, Turgeon R.** 2009. Phloem loading strategies in three plant species that transport sugar alcohols. *Plant physiology* **149**, 1601–1608.
- Reinders A, Schulze W, Thaminny S, Stagljar I, Frommer WB, Ward JM.** 2002. Intra- and intermolecular interactions in sucrose transporters at the plasma membrane detected by the split-ubiquitin system and functional assays. *Structure (London, England 1993)* **10**, 763–772.
- Reinders A, Sivitz AB, Ward JM.** 2012a. Evolution of plant sucrose uptake transporters. *Frontiers in plant science* **3**, 22.

- Reinders A, Sun Y, Karvonen KL, Ward JM.** 2012b. Identification of amino acids important for substrate specificity in sucrose transporters using gene shuffling. *The Journal of biological chemistry* **287**, 30296–30304.
- Rennie EA, Turgeon R.** 2009. A comprehensive picture of phloem loading strategies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 14162–14167.
- Riens B, Lohaus G, Heineke D, Heldt HW.** 1991. Amino Acid and sucrose content determined in the cytosolic, chloroplastic, and vacuolar compartments and in the Phloem sap of spinach leaves. *Plant physiology* **97**, 227–233.
- Riens B, Lohaus G, Winter H, Heldt HW.** 1994. Production and diurnal utilization of assimilates in leaves of spinach (*Spinacia oleracea* L.) and barley (*Hordeum vulgare* L.). *Planta*, 497–501.
- Riesmeier JW, Hirner B, Frommer WB.** 1993. Potato sucrose transporter expression in minor veins indicates a role in phloem loading. *The Plant cell* **5**, 1591–1598.
- Riesmeier JW, Willmitzer L, Frommer WB.** 1992. Isolation and characterization of a sucrose carrier cDNA from spinach by functional expression in yeast. *The EMBO journal* **11**, 4705–4713.
- Riesmeier JW, Willmitzer L, Frommer WB.** 1994. Evidence for an essential role of the sucrose transporter in phloem loading and assimilate partitioning. *The EMBO journal* **13**, 1–7.
- Rodríguez-Ramírez EC, Andrés-Hernández AR, Luna-Vega I.** 2021. Floral morphology and anatomy of *Fagus grandifolia* subsp. mexicana (Fagaceae), an endangered-relict tree of the Mexican montane cloud forest. *Botanical Sciences* **99**, 599–610.
- Rosell JA, Gleason S, Méndez-Alonzo R, Chang Y, Westoby M.** 2014. Bark functional ecology: evidence for tradeoffs, functional coordination, and environment producing bark diversity. *The New phytologist* **201**, 486–497.
- Rottmann TM, Fritz C, Lauter A et al.** 2018. Protoplast-Esculin Assay as a New Method to Assay Plant Sucrose Transporters: Characterization of AtSUC6 and AtSUC7 Sucrose Uptake Activity in Arabidopsis Col-0 Ecotype. *Frontiers in plant science* **9**, 430.

- Ruiz-Villalba A, van Pelt-Verkuil E, Gunst QD, Ruijter JM, van den Hoff MJ.** 2017. Amplification of nonspecific products in quantitative polymerase chain reactions (qPCR). *Biomolecular detection and quantification* **14**, 7–18.
- Russin WA, Evert RF.** 1985. Studies on the Leaf of *Populus deltoides* (Salicaceae): Ultrastructure, Plasmodesmatal Frequency, and Solute Concentrations. *American journal of botany* **72**, 1232.
- Ryan MG, Asao S.** 2014. Phloem transport in trees. *Tree physiology* **34**, 1–4.
- Ryan MG, Phillips N, Bond BJ.** 2006. The hydraulic limitation hypothesis revisited. *Plant, cell & environment* **29**, 367–381.
- Sadava D, Hillis DM, Heller HC, Hacker SD, Markl J.** 2019. Purves Biologie. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.
- Sala A, Hoch G.** 2009. Height-related growth declines in ponderosa pine are not due to carbon limitation. *Plant, cell & environment* **32**, 22–30.
- Sauer N.** 2007. Molecular physiology of higher plant sucrose transporters. *FEBS letters* **581**, 2309–2317.
- 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 for cell and molecular biology* **6**, 67–77.
- Savage JA, Clearwater MJ, Haines DF et al.** 2016. Allocation, stress tolerance and carbon transport in plants: how does phloem physiology affect plant ecology? *Plant, cell & environment* **39**, 709–725.
- Schmittgen TD, Livak KJ.** 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nature protocols* **3**, 1101–1108.
- Schneider S, Hulpke S, Schulz A et al.** 2012. Vacuoles release sucrose via tonoplast-localised SUC4-type transporters. *Plant biology (Stuttgart, Germany)* **14**, 325–336.
- Schulze W, Weise A, Frommer WB, Ward JM.** 2000. Function of the cytosolic N-terminus of sucrose transporter AtSUT2 in substrate affinity. *FEBS letters* **485**, 189–194.
- Scofield GN, Hirose T, Aoki N, Furbank RT.** 2007. Involvement of the sucrose transporter, OsSUT1, in the long-distance pathway for assimilate transport in rice. *Journal of experimental botany* **58**, 3155–3169.

- Secchi F, Pagliarani C, Zwieniecki MA.** 2017. The functional role of xylem parenchyma cells and aquaporins during recovery from severe water stress. *Plant, cell & environment* **40**, 858–871.
- Secchi F, Zwieniecki MA.** 2011. Sensing embolism in xylem vessels: the role of sucrose as a trigger for refilling. *Plant, cell & environment* **34**, 514–524.
- Shakya R, Sturm A.** 1998. Characterization of source- and sink-specific sucrose/H⁺ symporters from carrot. *Plant physiology* **118**, 1473–1480.
- Shen S, Ma S, Liu Y et al.** 2019. Cell Wall Invertase and Sugar Transporters Are Differentially Activated in Tomato Styles and Ovaries During Pollination and Fertilization. *Frontiers in plant science* **10**, 506.
- Sivitz AB, Reinders A, Johnson ME et al.** 2007. Arabidopsis sucrose transporter AtSUC9. High-affinity transport activity, intragenic control of expression, and early flowering mutant phenotype. *Plant physiology* **143**, 188–198.
- Slewiniski TL, Zhang C, Turgeon R.** 2013. Structural and functional heterogeneity in phloem loading and transport. *Frontiers in plant science* **4**, 244.
- Ślupianek A, Dolzblasz A, Sokołowska K.** 2021. Xylem Parenchyma-Role and Relevance in Wood Functioning in Trees. *Plants (Basel, Switzerland)* **10**.
- Soltis DE, Bell CD, Kim S, Soltis PS.** 2008. Origin and early evolution of angiosperms. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1133**, 3–25.
- Sompid Samipak.** 2009. The complex world of flower. *Thai Journal of Genetics* **2(2)**, 120–124
- Soni R, Carmichael JP, Murray JA.** 1993. Parameters affecting lithium acetate-mediated transformation of *Saccharomyces cerevisiae* and development of a rapid and simplified procedure. *Current genetics* **24**, 455–459.
- Stadler R, Brandner J, Schulz A, Gahrtz M, Sauer N.** 1995a. Phloem Loading by the PmSUC2 Sucrose Carrier from *Plantago major* Occurs into Companion Cells. *The Plant cell* **7**, 1545–1554.
- Stadler R, Sauer N.** 1996. The *Arabidopsis thaliana* AtSUC2 Gene is Specifically Expressed in Companion Cells. *Botanica Acta* **109**, 299–306.

- 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 for cell and molecular biology* **19**, 269–278.
- Stadler R, Wolf K, Hilgarth C, Tanner W, Sauer N.** 1995b. Subcellular localization of the inducible Chlorella HUP1 monosaccharide-H⁺ symporter and cloning of a Co-induced galactose-H⁺ symporter. *Plant physiology* **107**, 33–41.
- Stegner M, Buchner O, Geßlbauer M et al.** 2023. Frozen mountain pine needles: The endodermis discriminates between the ice-containing central tissue and the ice-free fully functional mesophyll. *Physiologia plantarum* **175**, e13865.
- Stein O, Granot D.** 2019. An Overview of Sucrose Synthases in Plants. *Frontiers in plant science* **10**, 95.
- Stothard P.** 2000. The sequence manipulation suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences. *BioTechniques* **28**, 1102–1104.
- Sun Y, Lin Z, Reinders A, Ward JM.** 2012. Functionally important amino acids in rice sucrose transporter OsSUT1. *Biochemistry* **51**, 3284–3291.
- Svec D, Tichopad A, Novosadova V, Pfaffl MW, Kubista M.** 2015. How good is a PCR efficiency estimate: Recommendations for precise and robust qPCR efficiency assessments. *Biomolecular detection and quantification* **3**, 9–16.
- Tamura K, Stecher G, Kumar S.** 2021. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular biology and evolution* **38**, 3022–3027.
- Thompson GA, Wang HL.** 2003. WATER RELATIONS OF PLANTS | Phloem. In: *Encyclopedia of Applied Plant Sciences*: Elsevier, 1449–1459.
- Turgeon R.** 1984. Efflux of sucrose from minor veins of tobacco leaves. *Planta* **161**, 120–128.
- Turgeon R, Beebe D, Gowan E.** 1993. The intermediary cell: Minor-vein anatomy and raffinose oligosaccharide synthesis in the Scrophulariaceae. *Planta* **191**, 446–456.
- Turgeon R, Medville R.** 1998. The absence of phloem loading in willow leaves. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 12055–12060.
- Turgeon R, Medville R.** 2004. Phloem loading. A reevaluation of the relationship between plasmodesmatal frequencies and loading strategies. *Plant physiology* **136**, 3795–3803.

- Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T et al.** 2012. Primer3--new capabilities and interfaces. *Nucleic acids research* **40**, e115.
- van Bel AJ, Gamalei YV, Ammerlaan A, Bik LP.** 1992. Dissimilar phloem loading in leaves with symplasmic or apoplasmic minor-vein configurations. *Planta* **186**, 518–525.
- van Bel AJ, Hafke JB.** 2005. Physiochemical Determinants of Phloem Transport. In: *Vascular Transport in Plants*: Elsevier, 19–44.
- van Bel AJE.** 2003. The phloem, a miracle of ingenuity. *Plant, cell & environment* **26**, 125–149.
- van Bel AJE, Hess P.** 2003. Kollektiver Kraftakt zweier Exzentriker: Phloemtransport. *Biologie in unserer Zeit* **33**, 220–230.
- Voitsekhovskaja OV, Koroleva OA, Batashev DR et al.** 2006. Phloem loading in two Scrophulariaceae species. What can drive symplastic flow via plasmodesmata? *Plant physiology* **140**, 383–395.
- Voitsekhovskaja OV, Rudashevskaya EL, Demchenko KN et al.** 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.
- Vosbeck KD, Greenberg BD, Awad WM.** 1975. The proteolytic enzymes of the K-1 strain of *Streptomyces griseus* obtained from a commercial preparation (Pronase). Specificity and immobilization of aminopeptidase. *Journal of Biological Chemistry* **250**, 3981–3987.
- Wang X-Q, Ran J-H.** 2014. Evolution and biogeography of gymnosperms. *Molecular phylogenetics and evolution* **75**, 24–40.
- Wei X, Liu F, Chen C, Ma F, Li M.** 2014. The *Malus domestica* sugar transporter gene family: identifications based on genome and expression profiling related to the accumulation of fruit sugars. *Frontiers in plant science* **5**, 569.
- Wei X-Y, Collings DA, McCurdy DW.** 2021. Review: More than sweet: New insights into the biology of phloem parenchyma transfer cells in Arabidopsis. *Plant science an international journal of experimental plant biology* **310**, 110990.
- Weise A, Barker L, Kühn C et al.** 2000. A new subfamily of sucrose transporters, SUT4, with low affinity/high capacity localized in enucleate sieve elements of plants. *The Plant cell* **12**, 1345–1355.

- Werner D, Gerlitz N, Stadler R.** 2011. A dual switch in phloem unloading during ovule development in *Arabidopsis*. *Protoplasma* **248**, 225–235.
- Winter H, Robinson DG, Heldt HW.** 1994. Subcellular volumes and metabolite concentrations in spinach leaves. *Planta* **193**, 530–535.
- Wirtz W, Stitt M, Heldt HW.** 1980. Enzymic determination of metabolites in the subcellular compartments of spinach protoplasts. *Plant physiology* **66**, 187–193.
- Wolfenstetter, S.** 2012. Analysen zur subzellulären Verteilung von Zucker- und Zuckeralkoholtransportern in *Arabidopsis thaliana*. Dissertation. Universitätsbibliothek der Universität Erlangen-Nürnberg, Erlangen.
- Woodcock DM, Crowther PJ, Doherty J et al.** 1989. Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic acids research* **17**, 3469–3478.
- Woodruff DR, Meinzer FC.** 2011. Water stress, shoot growth and storage of non-structural carbohydrates along a tree height gradient in a tall conifer. *Plant, cell & environment* **34**, 1920–1930.
- Wu X, Lin J, Lin Q, Wang J, Schreiber L.** 2005. Casparian strips in needles are more solute permeable than endodermal transport barriers in roots of *Pinus bungeana*. *Plant & cell physiology* **46**, 1799–1808.
- Würth MKR, Peláez-Riedl S, Wright SJ, Körner C.** 2005. Non-structural carbohydrate pools in a tropical forest. *Oecologia* **143**, 11–24.
- Yadav UP, Ayre BG, Bush DR.** 2015. Transgenic approaches to altering carbon and nitrogen partitioning in whole plants: assessing the potential to improve crop yields and nutritional quality. *Frontiers in plant science* **6**, 275.
- Yoo S-D, Cho Y-H, Sheen J.** 2007. *Arabidopsis* mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis. *Nature protocols* **2**, 1565–1572.
- Yuan M, Wang S.** 2013. Rice MtN3/saliva/SWEET family genes and their homologs in cellular organisms. *Molecular plant* **6**, 665–674.
- Zeller R, Rogers M, Haramis AG, Carrasceo AS.** 2001. In situ hybridization to cellular RNA. *Current protocols in molecular biology* **Chapter 14**, Unit 14.3.

Zhang C, Turgeon R. 2009. Downregulating the sucrose transporter VpSUT1 in *Verbascum phoeniceum* does not inhibit phloem loading. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 18849–18854.

Zhang C, Turgeon R. 2018. Mechanisms of phloem loading. *Current opinion in plant biology* **43**, 71–75.

Zhang H, Zhang S, Qin G et al. 2013. Molecular cloning and expression analysis of a gene for sucrose transporter from pear (*Pyrus bretschneideri* Rehd.) fruit. *Plant physiology and biochemistry PPB* **73**, 63–69.

Zhang L, Wang L, Zhang J et al. 2021. Expression and localization of SWEETs in *Populus* and the effect of SWEET7 overexpression in secondary growth. *Tree physiology* **41**, 882–899.

Zipper H, Brunner H, Bernhagen J, Vitzthum F. 2004. Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic acids research* **32**, e103.

Zrenner R, Willmitzer L, Sonnewald U. 1993. Analysis of the expression of potato uridinediphosphate-glucose pyrophosphorylase and its inhibition by antisense RNA. *Planta* **190**, 247–252.

Bundeswaldinventur 2012, <https://bwi.info/>, abgerufen: 24.07.2023

Daten und Fakten zum Klimawandel: Bergisches Land, Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (LANUV NRW):

https://www.lanuv.nrw.de/fileadmin/lanuvpubl/1_infoblaetter/07Factsheet_Bergisches_Land_211210.pdf, abgerufen: 24.07.2023

Daten und Fakten zum Klimawandel: Weserbergland, Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (LANUV NRW):

https://www.lanuv.nrw.de/fileadmin/lanuvpubl/1_infoblaetter/LANUV_Klima_Datenblatt_02_Weserbergland_WEB.pdf, abgerufen: 24.07.2023

Anhang

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------------|--|
| ADP | Adenosindiphosphat |
| AG | engl.: <i>ancient group</i> |
| Amp | Ampicillin |
| ANOVA | engl.: <i>analysis of variance</i> |
| AS | Aminosäure |
| ATP | Adenosintri-phosphat |
| BCIP | 5-Brom-4-chlor-3-Indoxylphosphat |
| BLAST | engl. <i>Basic Local Alignment Search Tool</i> |
| Bp | Basenpaare |
| BSA | engl. <i>bovin serum albumin</i> , dt. Rinderserumalbumin |
| BSZ | Bündelscheidenzelle |
| cDNA | complementary DNA |
| C _t | engl. <i>cycle threshold</i> |
| CTAB | Cetyltrimethylammoniumbromid |
| DEPC | Diethylcarbonat |
| DIG | Digoxigenin |
| DMF | Dimethylformamid |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| dNTP | desoxy-Nukleosidtriphosphate |
| DTT | Dithiothreitol |
| E. coli | lat. <i>Escherichia coli</i> |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| EGTA | Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure |
| EST | engl. <i>expressed sequence tag</i> |
| <i>et al.</i> | lat. <i>et alii</i> (dt. und andere) |
| EtOH | Ethanol |
| FG | Frischgewicht |
| GAP-DH | Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase |
| GFP | Grün fluoreszierendes Protein |
| GOI | engl. <i>gene of interest</i> |
| GZ | Geleitzelle |
| h | Stunde |
| HCl | Salzsäure |
| HEPES | 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure |
| HKG | engl. <i>housekeeping gene</i> |
| HPLC | engl. <i>high performance liquid chromatography</i> |
| IZ | Intermediärzelle |
| kB | Kilobasen |
| LB | engl. <i>lysogeny broth</i> |
| LiCl | Lithiumchlorid |
| MCS | engl. <i>multiple cloning site</i> |
| MES | 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure |
| MFS | engl. <i>major facility superfamily</i> |
| min | Minute |

| | |
|----------------------|---|
| mRNA | messenger RNA |
| NADP | Nicotinamidadeninucleotidphosphat |
| NBT | Nitroblautetrazoliumchlorid |
| NSC | engl. <i>non structural carbohydrates</i> |
| NTE | Natrium-TRIS-EDTA-Puffer |
| NWF | Nicht-wässrige-Fraktionierung |
| Pa | Pascal |
| PBS | Phosphatgepufferte Salzlösung |
| PCMBS | engl. <i>para-Chloromercuribenzenesulfonate</i> |
| PCR | engl. <i>polymerase chain reaction</i> , dt.: Polymerase-Kettenreaktion |
| PEG | Polyethylenglykol |
| PFA | Paraformaldehyd |
| PPZ | Phloemparenchymzelle |
| PVP | Polyvinylpyrrolidon |
| qPCR | quantitative Echtzeit-PCR |
| RFO | engl. <i>raffinose family oligosaccharides</i> |
| RG | Reaktionsgefäß |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| rpm | engl. <i>rounds per minute</i> |
| RT | Raumtemperatur |
| s | Sekunde |
| <i>S. cerevisiae</i> | lat. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> |
| SDS | engl. <i>sodium dodecyl sulfat</i> , dt.: Natriumlaurylsulfat |
| SE | Siebelement |
| SE-CC-Complex | engl. <i>sieve-element-companion-cell-complex</i> |
| SOB | engl. <i>super optimal broth</i> |
| SSC | engl. <i>saline sodium citrate</i> |
| SUT | engl. <i>sucrose uptake transporter</i> |
| SWEET | engl. <i>sugars will eventually be exported transporter</i> |
| <i>Taq</i> | lat. <i>Thermus aquaticus</i> |
| TEA-Puffer | TRIS-Acetat-EDTA-Puffer |
| TMHMM | engl. <i>transmembrane helix hidden Markov model</i> |
| TRIS | Tris(hydroxymethyl)aminomethan |
| tRNA | transfer-RNA |
| <i>Tukeys HSD</i> | engl. <i>Tukeys honestly difference test</i> |
| TWEEN | Polyethylenglykol-Sorbitan-Fettsäureester |
| ü.N. | über Nacht |
| UDP | Uridindiphosphat |
| UTP | Uridintriphosphat |
| v/v | Volumen pro Gesamtvolumen |
| w/v | Gewicht pro Gesamtvolumen |
| x g | relative Zentrifugalkraft |
| YPD | engl. <i>Yeast extract peptone dextrose</i> |

Liste verwendeter Laborgeräte

| Gerät | Hersteller | |
|------------------------------|----------------------------|-----------|
| Analysenwaage | Ohaus | |
| Autoklav | H+P Labortechnik | |
| Brutschrank | Labwit | |
| Elektrophoresekammer | Roth, LTF Labortechnik | |
| Feinwaage | Ohaus | |
| Fluoreszenzmikroskop | Leica | |
| Gefrierschrank (-20°C) | Privileg | |
| Gefriertruhe (-80°C) | Fryka | |
| Geldokumentation | Intas | |
| Gewebeinfiltrationsautomat | Leica | |
| Horizontalschüttler | VWR | |
| Heizschüttler | Analytik Jena, Grant | |
| HPLC-Systeme | Thermo Scientific, Dionex | |
| Hybridisierungssofen | Analytik Jena, Appligene | |
| Kugelmühle | Retsch | |
| Lyophylle | Chris | |
| Magnetrührer | VWR | |
| Mikroskope | Zeiss | |
| Mikrotom | Leica | |
| Minizentrifuge | Roth | |
| Nano-Drop One | Thermo Scientific | |
| pH-Meter | Mettler-Toledo | |
| Kolbenhubpipetten | VWR | |
| qPCR-System | Agilent | |
| Rotationsverdampfer | VWR | |
| Schüttelinkubator | VWR | |
| Spannungsgeber | LTF Labortechnik (Consort) | |
| Sterilwerkbank | Thermo Scientific | |
| Thermocycler PCR | Eppendorf | |
| Trockenbank für Objektträger | Electrothermal | |
| Trockenschrank | Binder, Heraeus | |
| UV-Transilluminator | Biometra | |
| Vortex-Schüttler | VWR | |
| Wasserbad | VWR | |
| Zentrifugen | | |
| | Biofuge pico | Heraeus |
| | Centrifuge 5424 | Eppendorf |
| | Centrifuge 5804R | Eppendorf |
| | Microstar 17 | VWR |
| | Microstar 17R | VWR |
| | Mikro 200R | Hettich |
| Rotoren | | |
| | 2427-A | Eppendorf |
| | A-4-44 | Eppendorf |
| | FA-45-24-11 | Eppendorf |

Liste verwendeter Chemikalien

| Chemikalie | Hersteller |
|---|----------------------|
| MES | Roth |
| X-Gal | Roth |
| BCIP | Roth |
| Adenosin-5'-triphosphat (ATP)-Dinatriumsalz | Roth |
| Agar-Agar | Roth |
| Agarose | Roth |
| Ampicillin | Roth |
| α -Amylase | Roche |
| Amyloglukosidase | Roche |
| Anti-Digoxigenin (DIG)-Antikörper | Roche |
| Biotin | Roth |
| Borsäure | Roth |
| Block-Reagenz | Roche |
| Calciumchlorid ($\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) | Roth |
| Calciumpantothenat | Roth |
| CTAB | Roth |
| Chloroform | VWR |
| Denhardt's Lösung | Sigma |
| dNTPs | Bio & Sell, Roth |
| Dextransulfat 500 Natriumsalz | Roth |
| DEPC | Roth |
| Digoxigenin-RNA-Markierungsmix | Roche |
| Di-Kaliumhydrogenphosphat ($\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$) | Roth |
| Di-Natriumdihydrogenphosphat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) | Roth |
| DMSO | Roth |
| DTT | Roth |
| Eosin G | Roth |
| Entellan [®] | Merck |
| Essigsäure | Roth |
| Essigsäure-Anhydrid | Merck |
| Ethanol | VWR, Fisher Chemical |
| Ethidiumbromid | Roth |
| EGTA | Roth |
| EDTA | Roth |
| Formaldehyd | Roth |
| Formamid, deionisiert | Roth |
| D-Fructose | Roth |
| Gamborg B5 Salze | Duchefa |
| Gamborg B5 Vitamin Mix | Duchefa |
| Glucose-1,6-Bisphosphat | Roche |
| Glutaraldehyd | Roth |
| Glycerin | Roth |
| Glycin | Roth |
| D-Glucose | Roth |
| Hefeextrakt | Roth |
| HEPES | Sigma Aldrich |

| | |
|--|-----------------------|
| Isoamylalkohol | Roth |
| Isopropanol | Roth |
| Kaliumchlorid (KCl) | Roth |
| Kaliumhydroxid (KOH) | Roth |
| Levamisol | Sigma-Aldrich |
| L-Glutamin | Roth |
| Lithiumchlorid (LiCl) | Roth |
| Magnesiumchlorid ($\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$) | Roth |
| Magnesiumsulfat ($\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$) | Roth |
| Mangan-(II)-Chlorid ($\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$) | Roth |
| D-Mannitol | Roth |
| β -Mercaptoethanol | Merck |
| Methanol | Roth |
| Dimethylformamid (DMF) | Roth |
| n-Heptan | VWR |
| Natriumacetat | Merck |
| Natriumcarbonat (Na_2CO_3) | Roth |
| Natriumcitrat | Roth |
| Natriumchlorid (NaCl) | Roth, Grüssing |
| Natriumdihydrogenphosphat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) | Roth |
| Natriumdodecylsulfat (SDS) | Roth |
| Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3) | Roth |
| Natriumhydroxid (NaOH) | Grüssing |
| NADP | Roth |
| Natriumfluorid (NaF) | Roth |
| NBT | Roth |
| Paraformaldehyd | Roth |
| Paraplast [®] | Leica |
| Paraplast Plus [®] | Leica |
| Phosphoglycerat-Kinase | Sigma Aldrich |
| p-Nitrophenylphosphat | Sigma Aldrich |
| PEG 4000 | Roth |
| PVP | Fluka |
| Pronase A | Roche |
| Rinderserumalbumin (BSA) | Roth |
| RNase Away [®] | Molecular Bioproducts |
| Rubidiumchlorid (RnCl) | Roth |
| D-Saccharose | Roth |
| Salzsäure (HCl) | VWR |
| Schwefelsäure (H_2SO_4) | Roth |
| Tetrachlorethylen | Merck |
| Triethanolamin | Roth |
| TRIS | Roth |
| Triton X-100 | Roth |
| tRNA | Roche |
| Trypton | Roth |
| Tween 20 | Roth |
| Xylol | Roth |

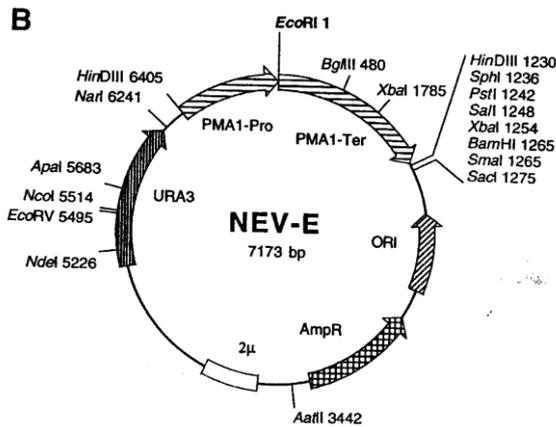
Sequenzen identifizierter SUTs und SWEETs

| Name | Sequenz (5' → 3') |
|---|---|
| FsSUT2 <u>Länge:</u> 1851 BP 617 AS | <p> ATGGCGGGAAAGACCGAGTCAGTGTGCGATCCGAGTTCCGTACAAGAACCTGAAGGAT GAAGCGGAAGTGGAAATGGTAGGAATGGACGAGTCATTTCACTCGGAAAACCATCGG ATCGATCTCAATTCTTCTTCTTCTTCCACCTTCATCTCCTTCTCCTTCTCCTTCTTCT TCATCTTCTTCTTTGCCTTCTTTTCTCCAGAGAGAAACACATTAGCTTGGTGACT CTGGTTCTCAGTTGTACGGTCCGCGCCGGTGTACAATTCCGGCTGGGCTTTACAGCTC TCGCTTTTGACTCCTTATATTACAGACTTGGAAATAGAGCATGCCCTTCTTTCATTT ATTTGGCTTTGTGGCCCTATTACAGGTCTTGTGGTTCAACCTTGTGTGCGGTATTTGG AGTGATAAATGCACTTCCAAATATGGAAGAAGACGGCCATTTATTCTTATAGGATCT CTCATGATCTCAGTAGCAGTGATATTAATCGAGTTTTCTGCAGACATTGGATATATA ATAGGTGATGCAAAGGAGCATTGCAGTTCATACAAAGGTACCCGAACAAGGGCAGCT ATTTGTCTTTATTGTTGGTTTCTGGCTGCTGGATCTTGCCAACAATACAGTGCAGGGA CCGGCTCGTGCCCTTTTGGCCGATCTATCAGGTCTGATCAACGTAATTCAGCAAAT GCTATATTTTGTCTCATGGATGGCTGTTGGAAACATCCTAGGATTCTCTGCTGGTGCT AGTGGAAATGGCACAGATGGTTTCCATTCCCTGATGAGTAGAGCTTGTGTGAAGCT TGTGGAAATCTCAAAGCAGCATTTCTTGTGTCAGTGGTTTTCTGACTCTTTGCACT CTTGTGACTCTTTATTTTGCGAAGGAGGTTCCACTTACTGTTAATCAGCCCCACCGT CTGTGCGATTCTGCACCTTTATTGGATGATACTCGACAAAATGGCCTTGACCATTGCG AAGTCAAAGCCTGATATGCCAAATATTGATAATGCCAATGGTAACAGCACTGCAGGT GTTAATGAAAGGGATAAAAACCTAACACAAGTCAACTCTAAAGTTGAGGATCATCAA AATGAAAGCTTTAATGATGGCCCTGGAGCTGTGTTAGTCAATTTGTTGACTAGTTTA CGGCATTTACCGCCTGCGATGCATTCAGTGCTTATTGTTATGGCTTTACTTGGTTG TCCTGGTTCCCTTCTTTCTTTTTGATACCGATTGGATGGGGAGGGAAGTTTATCAT GGAGATCCGAAAGGAGAACGTTCTGATGTAAGTATGACCAAGGTGTCAGACAA GGTGCATTTGGTTTGTCTATTGAATTCAGTTGTTCTTGGCGTTAGTTCTTTCCCTTATT GAGCCAATGTGTAAGTGGTTTGGTGCAAGACTTGTATGGGCAATGAGCAATTTTATT GTGTTTGCCTGCATGGCTGGCACCGCTATCATTAGTTTGGTATCTGTCCGAGGATAT TCTGAAGGGATTCAACATGTAATTGGTGGGAGTGCAGCAATCAGGACAGCTGCCTTG GTTTTATTTGCTCTTCTTGGCTTTCTCTTGTCTATTACATACAGTGTCCATTTTCT CTCACAGCAGAGTTGACTGCTGATTCAGGTGGCGGCCAAGGGCTGGCTATAGGAGTT CTAAATCTTGCAATTGTTGTTCCACAGATGATTGTATCACTTGGTGGCGGACCGTGG GATGCTTTATTTGGTGGAGGAAATATTCCTGCCTTTGTTTTGGCTTCTTCTCTGCC TTTGCAGCTGGTGTATTGCAATCCGCAGGCTGCCAAATCTTTCCAGCAGTTCTTTT ACGTCATCTGGTTTTTCATTTTGGTTAA </p> <p> MAGKTESVSIRVPYKNLKDEAEVEMVGMDESFHSENHRIDLNSSSSSPSSPSPLPSS SSSSLPSFPREKHI SLVTLVLSCTVAAGVQFGWALQLSLLTPYIQTLGIEHAFSSF IWLCGPITGLVVQPCVGIWSDKCTSKYGRRRPFILIGSLMISVAVILIEFSADIGYI IGDAKEHCSSYKGRTRAAIVFIVGFWLLDLANNVQGPARRALLADLSGPDQRNSAN AIFCSWMAVGNILGFSAGASGNWHRWFPFLMSRACCEACGNLKAFLVAVVFLTLCT LVTLYFAKEVPLTVNQPHRLSDSAPLLDDTRQNGLDHSSKSPDMPNIDNANGNSTAG VNERDKNLTQVNSKVEDHQNESFNDGPGAVLVNLLTSLRHLPPAMHSVLIVMALTWL SWFPPFLFDTDWMGREVYHGDPKGERSDVLKYDQGVQGAFLLLNSVVLGVSSFLI EPMCKWFGARLVWAMSNFIVFACMAGTAIISLVSVRGYSEGIQHVIGGSAAIRTAAL VLFALLGFPLAITYSVPFSLTAEALTADSGGGQGLAIGVLNLAIVPQMIIVSLGAGPW DALFGGGNIPAFVLASFSAFAAGVIAIRRLPNLSSSSFTSSGFHFG </p> |

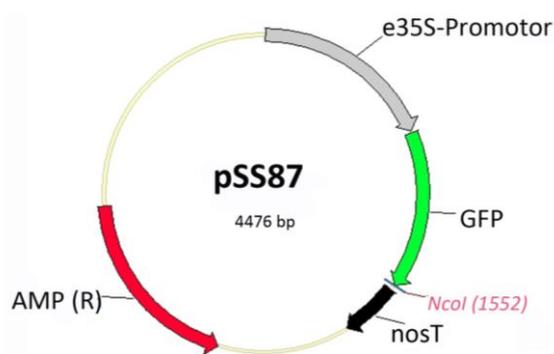
| | |
|---|--|
| <p>FsSUT4 <u>Länge:</u> 1527 Bp 509 AS</p> | <p>ATGGAGAGATCGGAGCGAGGCAAGCGAATGGCGATTCCAGAAGCCGAGCGCCATGGA GCCAGGGCTCGACCACCGGTTTCGACCAAGGGTTCCGTTGCGCCAATTACTCCGAGTA GCATCGGTGGCGTGTGGGATTTCAGTTCGGCTGGGCTTTACAGCTGTCTCTACTCACG CCGTACGTGCAAGAGCTGGGGATTCCACACGCGTGGGCCAGCGTGATATGGCTATGC GGCCCCGCTCTCCGGTTTGATAGTCCAGCCTCTTGTGGGCCACATGAGTGACAGGTGT ACCAGCAAGTTCGGGAGACGGAGGCCGTTTCATTTTGGTGGGAGCGGTTTCGATCGTC GTGGCAGTCTTGATCATCGGACACTCGGCGGATATCGGGTGGTTGCTTGGTGATCGT GGCGATACGAGGCCGAGGGCGGTGGCGGTTTTTCGTTTTTCGGGTTTTGGATTCTGGAT GTGGCTAATAACATGACTCAAGGTCCTTGTAGAGCTCTATTAGCTGATCTCACAGGA AAGGATCATAGAAGGACGCGAGTGGCGAATGCGTATTTCTCTCTGTTTTATGGCTGTT GGCAATATTCTTGGCTTTGCGACTGGATCATATAGTGGCTGGTTCAAAGTTTTTCCG TTTACTTACACCTCTGCATGCAATGCTAACTGTGCAAATCTCAAGTCTGCTTTTTTT ATTGATGTTGTGTGCATTGCAATTACTACGTATGTAAGTATATCGGCAGCTCAGGAA GTGCCAATAAGTTTTGAGTGATAGATCCACCACCCATGCTGTTGAAGATGGGACAGGA ACCTCGGGTCAAGCTGAAGAAGCTTTCCTCTGGGAATTGTTTGGGACTTTTAAATAT TTTTCAGGGTCTATATGGGTAATCCTGTGTGTTACTGCTTTGAATTGGATTGGTTGG TTTCCATTCTTTCTTTTTGATACGGATTGGATGGGCCGAGAGATTTATGGTGGCAAG CCTAATGAAGGGCAGAATTATAGTACTGGAGTTAGAATGGGTGCGCTTGGTCTGATG TTGAATTCAGTTGTTCTTGGGAATAACTTCGGTGCTCATGGAGAAGCTCTGCAGTAAG TGGGGGGCCGGTTTTGTGTGGGGGATTTCGAATATCCTCATGGCTCTCTGCTTTATT GCAATGCTAGTAATTAGCTTTGTGGCGAAGAGTTTTGACTTTGTGAGCCATCCTCAA CCTCCAGATGGCATTGTAATAGCTGCTCTGGTGATTTTTGCAATCTTGGTGTTCCT TTGGCTATCACTTACAGCGTTCATATGCCTTAATATCCTCACGTATAGAGTCTTTG GGACTTGGCCAAGGATTATCGATGGGTGTTTTGAATCTGGCAATAGTTATCCCACAG GTGGTGGTGTCCCTGGGAAGTGGACCATGGGATCAGCTATTTGGTGGTGGAAATCT CCTGCCTTCGCTGTGGCAGCACTTGCAGCCTTAGCTAGTGGACTAGTAGCCATCTTA GCTATTCTCGATCTGGTCCTCAGAAGCCCAGAGCCCTCACATGA</p> <p>MERSERGKRMAIPEAERHGARARPPVRPRVPLRQLLRVASVACGIQFGWALQLSLLT PYVQELGIPHAWASVIWLCGPLSLIVQPLVGHMSDRCTSKFGRRRPFILVGAIV VAVLIIGHSADIGWLLGDRGDTRPRAVAVFVFGFWILDVANMTQGPCRALLADLTG KDHRRTRVANAYFSLFMAVGNILGFATGSYSGWFKVFPFTYTSACNANCANLKSFAF IDVVCIAITTYVVISAAQEVPISLSDRSTTHAVEDGTGTSQAEAEFLWELFGTFKY FSGSIWVILCVTALNWIGWFPFLFDTDWMGREIYGGKPNEGQNYSTGVRMGALGLM LNSVVLGITSVLMEKLCCKWGAGFVWGISNILMALCFIAMLVISFVAKSFDFVSHPO PPDGIVIAALVIFAILGVPLAITYSVPYALISSRIESLGLGQLSMGVLNLAIVIPQ VVVSLSGSPWDQLFGGNSPAFAVAALAALASGLVAILAI PRSGPQKPRALT</p> |
| <p>Qr SWEET12 <u>Länge:</u> 846 Bp 281 AS</p> | <p>ATGGTTTCCACTCACAGTCCCTTGGTATTTGCGTTTGGCATTCTTGGTAACATTATA TCCTTCGTGGTTTTTCTAGCCCCAGTACCAACCTTTATTAGGGTTTATAAGAAGAAA TCAACAGAAGGGTTTCAGTCAGTTCATATGTGGTTGCACTATTCAGCGCCATGCTT TGGTTATACTATGCATCACTTAAATCTGATGAAATCCTTCTTATTACTGCAAACACA GTCGGTTGTGTTGTGGAAACCATTTACATTGCCATTTACATCGTTTTTGCACCAAAG CAAGCCAGGACTTTACATTGAGGATTCTTATTCTGATGAACTTTGGGGGATTTGGC TCGATTCTTCTTCTCTCACACTTCTTAGCTCAAGGAGAAACCCGTGTCCGAGTTCTT GGTTGGGTTTTGTGTAGCTTTTTCCGTGTCCGTCTTTGCAGCACCTCTAAGCATCATG AGGCTGGTCATACGCACGAAAAGCGTAGAGTTCATGCCATTTTATTTGTCACTTTTT CTCACACTCAGCGCAATCATGTGGCTTTTATATGGTGTACTACAGAAGGATTTGTAT GTTGCCTTCCAAACATATTGGGTTTCGTCTTTGGGGTGCTTCAGATGGTACTTTAT ATGATCTACAAGAATTACAAGACAGTTATAGACGATGAAAAGCTATCTGGAAGCAA GCTGATATTGTAAACCTGAGCATGTCTGAGACAAATGTGTGCTCTCAGCCCAATCA GATGAAAAAGGGATCAGTGACACTCAAATGAGCTTGAACAAAAAGATCAAGATGTG AGAACCATGGAAGCCTCCAACCAAGGCCAGTTATCTGTTAAAGTGTGA</p> |

| | |
|--|--|
| | <p>MVSTHSPLVFAFGILGNIISFVVFLAPVPTFIRVYKKKSTEGFQSVPYVVALFSAML WLYYASLKSDEILLITANTVGCVVETIYIAIYIVFAPKQARTFTLRILILMNFGGFG SILLLSHFLAQGETRVRVLGWVCVAFSVSVFAAPLSIMRLVIRTKSVEFMPFYLSLF LTLSAIMWLLYGVLQKDLYVALPNILGFVFGVLMVLYMIYKNYKTVIDDEKLSGSK ADIVNLSMSETNVCSPNSDEKGISDTQNELEQKDQDVRTMEASNQGQLSVKV</p> |
| <p>FsSWEET 12_EST Länge: 306 Bp</p> | <p>ATGGTTTCCACTCACAGTCCCTTGGTATTTGCGTTTGGCATTCTTGTAACATTATA TCCTTCGTGGTTTTCTAGCCCCAGTACCAACCTTTATTAGGGTTTATAAGAAGAAA TCAACAGAAGGGTTTCAGTCAGTTCATATGTGGTTGCACTATTCAGCGCCATGCTT TGGTTATACTATGCATCACTTAAATCTGATGAAATCCTTCTTATTACTGCAAACACA GTCGGTTGTGTTGTGGAAACCATTTACATTGCCATTTACATCGTTTTTGCACCAAAG CAAGCCAGGACTTTACATAA-</p> <p>MVSTHSPLVFAFGILGNIISFVVFLAPVPTFIRVYKKKSTEGFQSVPYVVALFSAML WLYYASLKSDEILLITANTVGCVVETIYIAIYIVFAPKQARTFT-</p> |

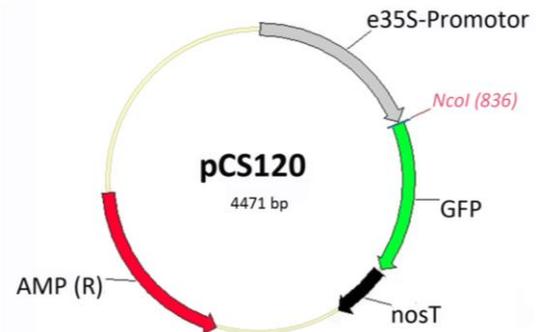
Plasmidkarten



Quelle: Sauer und Stolz (1994)



Quelle: Wolfenstetter (2012)



Quelle: Wolfenstetter (2012)

Liste verwendeter Primer bzw. Oligonukleotide

Fagus sylvatica

| Name | Sequenz (5' – 3') | Verwendung | Quelle |
|---------------|---|--|----------------------------------|
| FsSUT2_orf_f | ATGGCGGGAAAGACCGAGTCAG | Vollängen Primer | diese Arbeit |
| FsSUT2_orf_r | TTAACCAAAATGAAAACCAGATGACGTGAA AGAAC | | |
| FsSUT4_orf_f | ATGGCGATTCCAGAAGCCG | | |
| FsSUT4_orf_r | TCATGTGAGGGCTCTGGGC | | |
| FsSUT4_orf3_f | ATGGAGAGATCGGAGCGAGGCAAG | | |
| FsSUT4_orf3_r | TCATGTGAGGGCTCTGGGCTTCTG | | |
| q2_FsEST1_f | GTCCAATCTCTGGCATGCTT | qPCR-Primer SUT | Dobbelstein <i>et al.</i> , 2019 |
| q2_FsEST1_r | GGCTTTGTCTAAGCGGTCAC | | |
| qFsSUT2b_f | CAAAGGAGCATTGCAGTTCA | | |
| qFsSUT2a_r | TCCACTAGCACCAGCAGAGA | | Miehe <i>et al.</i> , 2023 |
| q1_FsSUT3_f | GGCAATATTCTTGGCTTTGC | | Dobbelstein <i>et al.</i> , 2019 |
| q2_FsSUT3r | CCTGTCCCATCTTCAACAGC | | |
| Fs_GAPDH_f | CAAGCCTGAGTTCAATGTCG | qPCR-Primer HKG | Miehe <i>et al.</i> , 2023 |
| Fs_GAPDH_r | CTCCAGTCCTTGCTAGATGG | | |
| FsSUT1_ish2_f | TCCCTTTCACAATGACCAAAGC | Sondenprimer <i>in-situ</i> - Hybridisierung | diese Arbeit |
| FsSUT1_ish2_r | CCTTCCCATCCAATCAGTGTC | | |
| FsSUT2_ish2_f | GGCACAGATGGTTTCCATTCC | | |
| FsSUT2_ish2_r | CCTTGGTCATACTTCAGTACATCAG | | |
| ish1_FsSUT4_f | TAGCTGATCTCACAGGAAAGG | | |
| ish1_FsSUT4_r | TGCAGAGCTTCTCCATGAG | | |
| q2_FsSUT3r | CCTGTCCCATCTTCAACAGC | | |
| FsSUT1_ish2_f | TCCCTTTCACAATGACCAAAGC | | |
| FsSUT1_ish2_r | CCTTCCCATCCAATCAGTGTC | | |
| FsSUT2_ish2_f | GGCACAGATGGTTTCCATTCC | | |
| FsSUT2_ish2_r | CCTTGGTCATACTTCAGTACATCAG | | |
| ish1_FsSUT4_f | TAGCTGATCTCACAGGAAAGG | | |
| ish1_FsSUT4_r | TGCAGAGCTTCTCCATGAG | | |

Quercus robur

| Name | Sequenz (5' – 3') | Verwendung | Quelle |
|-------------------|-------------------------------|--------------------------------|--|
| QrSUT2_voll_f | ATGGCGGGCAAGACCGAGT | Volllängen | Dobbelstein <i>et al.</i> , 2019 |
| QrSUT2_voll_r | TTAACCAAATGAAAACCAGATGACCTGAA | Primer | |
| QrSUT3_orf2_f | ATGGAGAGATCGGAGCGAGGAAAAC | | diese Arbeit |
| QrSUT3_orf3_r | TCATATGAGGGCTCTGGGGGCTTTGAG | | |
| qQr_SUT1_for | CGCCGTAGACCCTTTATT | qPCR-Primer | Öner-Sieben <i>et al.</i> , 2015 |
| qQr_SUT1_rev | AAAACCCAACCACAAACA | SUT | |
| Qr_qSUT2_f | CTCTTCTGGCCGATCTATC | | Dobbelstein <i>et al.</i> , 2019 |
| Qr_qSUT2_r | GCAAGCACTACTTGTGAGG | | |
| Qr_qSUT3_f | TGGAGAAGCTCTGCAGTAAG | | Dobbelstein <i>et al.</i> , 2019 |
| Qr_qSUT3_r | CATTTGGAGGTAGAGCCTTG | | |
| Qr_EF1_f | GCTGTGGTGGAAACTCTGT | qPCR-Primer | Rasheed-Depardieu <i>et al.</i> , 2012 |
| Qr_EF1_r | TCAATAATCAACTACCCGACTCAT | HKG | |
| QrSUT1_ish2_f | TAGCTGATCTTTCCTCAAATGACCAG | Sondenprimer | diese Arbeit |
| QrSUT1_ish2_r | CACCGGATGACCATTGCGAG | <i>in-situ</i> -Hybridisierung | |
| QrSUT2_ish1_f | GTTTCCATTCCCTGACAAGTAGTGC | | |
| QrSUT2_ish1_r | GGATCTCCATGATAAACTTCCCTCC | | |
| QrSUT3_ish1_f | TTGCCGATCTCACAGGAAAGG | | |
| QrSUT3_ish2_r | CAGAGCTTCTCCATGAGCAA | | |
| QrSWEET12_b_fwd | GGTTTCCACTCACAGTCC | PCR-Primer | diese Arbeit |
| QrSWEET12_b_rev | CGTGAAAATCCTGGCTTG | SWEETs-Verifizierung | |
| QrSWEET12_V_L_fwd | ATGGTTTCCACTCACAGTCC | | |
| QrSWEET12_V_L_rev | TCACACTTTAACAGATAACTGGC | | |
| QrSWEET12_c_fwd | TGTGGTTGCACTATTCAGCG | | |
| QrSWEET12_c_rev | ATGTGAAAGTCCTGGCTTGC | | |
| QrSWEET12_e_fwd | ACAGTCGGTTGTGTTGTGG | | |
| QrSWEET12_e_rev | AAACCCAACCAAGAACTCGG | | |

Picea abies

| | | | |
|------------------|--------------------------|--|-------------------------------------|
| PaSUT1q(2)_f | AACAACCTGCACTCACTTGGATTG | qPCR-Primer | Dobbelstein <i>et al.</i> , 2019 |
| PaSUT1q(2)_r | AGTGATCCTGCTCTAACACCTTG | | |
| PaSUT2q_fwd | GATGGGACGGGAAGTATATCAGG | | |
| PaSUT2q_rev | GCTGACTCCAAGCACAATAGAG | | |
| UBC1_hkg_pa_f | GGAACAGTGGAGTCCTGCTT | qPCR-Primer HKG | Palovaara und Hakman, 2008 |
| UBC1_hkg_pa_r | CCTTGCGGTGGACTCATATT | | |
| PaSUT1_Sonde_fwd | GCTGTGCCAATCTAAAGTCTGC | Sondenprimer <i>in-situ</i> - Hybridisierung | Fink (2019) |
| PaSUT1_Sonde_rev | CTTCACGACCCATCCAATCTG | | |
| PaSUT2_Sonde_fwd | TGTGGAAACTTGAAAGCAGC | | |
| PaSUT2_Sonde_rev | CCTGATATACTTCCCGTCCC | | |

Primer für die heterologe Hefeexpression

| Art | Name | Sequenz | Quelle |
|------------------------|----------------|---|-------------------------------|
| <i>Fagus sylvatica</i> | FsSUT1_NEV-N_f | ATAGCGGCCGCAAGCTTGTAAGAAATGGA GGTTGAGAATAGAGCAGCAGGT | Dobbelstein (2019) |
| | FsSUT1_NEV-N_r | ATAGCGGCCGCTCAATGGAAGGTAGCGATGG TAGAG | |
| | FsSUT2_NEV-N_f | ATAGCGGCCGCAAGCTTGTAAGAAATGGC GGGAAAGACCGAGTCAG | Miehe <i>et al.</i> , 2023 |
| | FsSUT2_NEV-N_r | ATAGCGGCCGCTTAACCAAAATGAAAACCAG ATGACGTGAAAGAAC | |
| | FsSUT4_NEV-N_f | ATAGCGGCCGCAAGCTTGTAAGAAATGGA GAGATCGGAGCGAGGCAAG | |
| | FsSUT4_NEV-N_r | ATAGCGGCCGCTCATGTGAGGGCTCTGGGCT TCTG | |
| <i>Quercus robur</i> | QrSUT2_NEV-N_f | ATAGCGGCCGCAAGCTTGTAAGAAATGGC GGGCAAGACCGAGT | |
| | QrSUT2_NEV-N_r | ATAGCGGCCGCTTAACCAAAATGAAAACCAG ATGACCTGAA | |
| | QrSUT4_NEV_N_f | ATAGCGGCCGCAAGCTTGTAAGAAATGGA GAGATCGGAGCGAGGAAAAC | |
| | QrSUT4_NEV_N_R | ATAGCGGCCGCTCATATGAGGGCTCTGGGGG CTTTGAG | |

Primer für die intrazelluläre Lokalisation von SUTs

| Art | Name | Sequenz | Quelle |
|------------------------|----------------------------|---|--------------|
| <i>Fagus sylvatica</i> | FsSUT1-5'-BsmBI | CGTCTCCCATGGAGGTTGAGAATAGAGCAGC AGGT | diese Arbeit |
| | FsSUT1-3'-BsmBI m. Stop | CGTCTCCCATGGTCAATGGAAGGTAGCGATG GTAGAG | |
| | FsSUT1-3'-BsmBI o. Stop | CGTCTCCCATGGATGGAAGGTAGCGATGGTA GAGG | |
| | FsSUT2-5'-NcoI | CCATGGCGGGAAAGACCGAGTCAG | |
| | FsSUT2-3'-NcoI m. Stop | CCATGGTTAACCAAAATGAAAACCAGATGAC GTGAAAGAAC | |
| | FsSUT2-3'-NcoI o. Stop | CCATGGCAAAATGAAAACCAGATGACGTGA AAGAAC | |
| | FsSUT4-5'-PciI | ACATGTATCAGAGATCGGAGCGAGGCAAG | |
| | FsSUT4-3'-PciI m. Stop | ACATGTTTATGTGAGGGCTCTGGGCTTCTG | |
| | FsSUT4-3'-PciI o. Stop | ACATGTTGAGGGCTCTGGGCTTCTGAGG | |
| <i>Quercus robur</i> | QrSUT1-5'-NcoI | CCATGGAAGTTGAAAGAGCTAGTTCTGA | diese Arbeit |
| | QrSUT1-3'-NcoI m. Stop | CCATGGTCAATGACAAGCAGTGATGACAGG | |
| | QrSUT1-3'-NcoI o. Stop | CCATGGGACAAGCAGTGATGACAGG | |
| | QrSUT2-5'-NcoI | CCATGGCGGGCAAGACCGAGT | |
| | QrSUT2-3'-NcoI m. Stop | CCATGGTTAACCAAAATGAAAACCAGATGAC CTGAA | |
| | QrSUT2-3'-NcoI o. Stop | CCATGGCAAAATGAAAACCAGATGACCTGAA | |
| | QrSUT4-5'-PciI | ACATGTATCAGAGATCGGAGCGAGGAAAAC | |
| | QrSUT4-3'-PciI m. Stop | ACATGTTTATATGAGGGCTCTGGGCTTCTGA GG | |
| | QrSUT4-3'-PciI o. Stop | ACATGTTGAGGGCTCTGGGCTTCTGAGG | |

Stock-Lösungen für die *in-situ*-Hybridisierung

| Lösung | Zusammensetzung |
|----------------------|--|
| 2 M TRIS-HCl, pH 7,5 | 242,3 g TRIS in 1 l DEPC-Wasser, autoklaviert |
| 8,5 % NaCl | 8 g NaCl in 1 l DEPC-Wasser, autoklaviert |
| 10x PBS-Puffer | 1,5 M NaCl 0,07 Na ₂ HPO ₄ 0,03 NaH ₂ PO ₄ in DEPC-Wasser, autoklaviert |
| 20x Pronase-Puffer | 1 M TRIS-HCl, pH 7,5 0,1 M EDTA in DEPC-Wasser, autoklaviert |
| Pronase | 40 mg/ml Pronase in DEPC-Wasser 4 h bei 37°C inkubiert, Lagerung bei -20°C |
| 10 % Glycin | 10 g Glycin in 100 ml DEPC-Wasser |
| 20x SSC | 3 M NaCl 0,3 M Natriumcitrat in DEPC-Wasser, autoklaviert |
| 10x NTE | 5 M NaCl 100 mM TRIS-HCl, pH 7,5 10 mM EDTA in Reinstwasser, autoklaviert |
| 10x DIG-Puffer 1 | 1 M TRIS-HCl, pH 7,5 1,5 M NaCl |

Datenbanken mit Web-Adressen

| Name | Web-Adresse |
|--------------------|---|
| Agilent Aria | https://www.agilent.com |
| Bioedit | https://bioedit.software.informer.com |
| Blast | https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi |
| Chromeleon | - |
| Deep TMHMM | https://dtu.biolib.com/DeepTMHMM |
| Expasy | https://web.expasy.org/translate/ |
| GenBank | https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/ |
| MEGA 11 | https://www.megasoftware.net/ |
| PeakNET | - |
| Perl Primer | https://perlprimer.sourceforge.net/ |
| Primer 3 | https://primer3.ut.ee/ |
| Protter | https://wlab.ethz.ch/protter/# |
| Reverse complement | https://www.bioinformatics.org |
| ZEN | https://www.zeiss.de |

Danksagung

Mein großer Dank gilt Prof. Dr. Gertrud Lohaus. Für die Bereitstellung des Themas, die fachliche Betreuung, die große Offenheit für Fragen und Anregungen sowie die persönliche Unterstützung während der gesamten Dauer dieser Arbeit danke ich dir von ganzem Herzen.

Herzlich möchte ich Prof. Dr. Julia Bornhorst für die freundliche Übernahme des Koreferats sowie für die Mitbenutzung der Labore der Lebensmittelchemie danken.

An dieser Stelle möchte ich mich ganz besonders bei der gesamten AG Botanik bedanken!

Meinen Büropartnern aus V.12.089, Laura und Thomas, danke ich für den vielen Spaß, den wir neben der Arbeit hatten und die ernstesten aber vor allem fröhlichen Momente. Liebe Laura, ich danke dir für die Einarbeitung in die Welt der Molekularbiologie, für unsere zahlreichen lustigen Momente, den gemeinsamen Frust und die Tipps, die wir ausgetauscht haben, wenn es im Labor Probleme gab, die vielen fachlichen und persönlichen Gespräche und den großen Spaß, den wir beim Dekorieren unseres Büros und beim jährlichen Schmücken und Aussuchen des Weihnachtsbaumes hatten. Lieber Thomas, ich danke dir für die Hilfe bei den HPLC-Messungen und das Korrekturlesen dieser Arbeit. Vor allem aber danke ich dir für die oft langen Abende im Labor, die mit dir so viel angenehmer waren, für das Planen und die strukturierte Umsetzung unserer kreativen Bastelideen, die mir so viel Freude gemacht haben und für die vielen fachlichen und persönlichen Ratschläge, die du mir gegeben hast. Ihr beiden wart mir besonders wertvolle Kollegen und dafür möchte euch ganz herzlich danken!

Jonathan und Dustin, euch danke ich für die vielen interessanten Gespräche, die wir besonders während den Mittagspausen zum Thema Ernährung geführt haben. Jonathan, dir danke ich auch für dein großes Wissen zu vielen undenkbaaren Themen, mit dem du meinen Horizont auch bereits während des Studiums erweitert hast. Antje, dir danke ich ebenfalls besonders für die fachlichen und privaten Ratschläge und deine Offenheit bei der Lösung von Problemen. Katinka und Anja möchte ich für die Hilfe bei allen bürokratischen Angelegenheiten danken. Tim danke ich für die Hilfe im Labor, vor allem für die Durchführung der Nicht-wässrigen Fraktionierung. Ralf danke ich für das Sammeln der Proben der Buchen und Fichten im Solling sowie für die große technische Unterstützung bei den Reparaturen diverser Laborgeräte.

Den Arbeitsgruppen Zoologie und molekulare Zellbiologie möchte ich für die Mitbenutzung der Labore sowie für die kollegiale und freundliche Arbeitsatmosphäre auf unserer Etage danken.

Herrn Dr. Franz Klebl von der Universität Erlangen-Nürnberg danke ich für die freundliche Kooperation bei der Durchführung der Saccharose-Aufnahmetests in Hefezellen.

An dieser Stelle möchte ich meinen Freunden und meiner Familie danken, die mich motiviert, in meinen Entscheidungen unterstützt und vor allem aber von der Arbeit abgelenkt haben.

Ganz besonders danke ich meinem Partner Thorsten. Ich danke dir, dass du mich immer wieder und insbesondere in der Endphase dieser Arbeit bestärkt hast, weiterzumachen, deine positive Sicht auf die Dinge, dass es dir immer gelingt, mich zum Lachen zu bringen und vor allem dafür, dass du mir so liebevoll zur Seite stehst.

Mein größter Dank gilt meiner Mutter. Für deine unendlich große Unterstützung, die du mir schon immer warst, für all deine Zusprüche und Ratschläge, die mich zu meinen Lebenswegen und Entscheidungen ermutigt haben, deinen Optimismus, deine Fröhlichkeit und Freundlichkeit, die du an mich weitergegeben hast. Ich danke dir für Alles.

Lebenslauf

Der Lebenslauf ist aus Gründen des Datenschutzes in der elektronischen Version dieser Dissertation nicht enthalten.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, Wiebke Dorothea Miehe, diese Arbeit selbstständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet zu haben.

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

Ort, Datum, Unterschrift