

**Phloembeladungsmechanismen bei *Pinus  
sylvestris* und der Einfluss von Trockenstress auf  
den Zuckertransport in ausgewählten Nadel- und  
Laubbäumen**

**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades

der Fakultät für Mathematik und Naturwissenschaften der

Bergischen Universität Wuppertal

angefertigt in der

Arbeitsgruppe für Molekulare Pflanzenforschung/Pflanzenbiochemie (Botanik)

vorgelegt von

**Laura Czempik**

Wuppertal, im Juli 2023



BERGISCHE  
UNIVERSITÄT  
WUPPERTAL

1. Gutachterin: Prof in Dr. Gertrud Lohaus, Bergische Universität Wuppertal
2. Gutachterin: Prof in Dr. Gela Preisfeld, Bergische Universität Wuppertal

*“A scientist in his laboratory is not a mere technician: he is also a child confronting natural phenomena that impress him as though they were fairy tales.”*  
Marie Curie

# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>V</b>
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1  Aufbau und Funktion des Phloems .....	1
1.1.1  Aufbau des Phloems in Angiospermen.....	2
1.1.2  Aufbau des Phloems in Gymnospermen.....	2
1.1.3  Transport im Phloem .....	4
1.2  Mechanismen der Phloembeladung .....	6
1.2.1  Passive Phloembeladung.....	6
1.2.2  Symplastische Beladung durch <i>polymer trapping</i> .....	7
1.2.3  Apoplastische Beladung durch Saccharosetransporter .....	8
1.3  Struktur und Funktion von Saccharosetransportern.....	9
1.4  Trockenstress in Bäumen .....	12
1.5  Fragestellung .....	13
<b>2. Material und Methoden .....</b>	<b>15</b>
2.1  Material .....	15
2.1.1  Chemikalien und Geräte .....	15
2.1.2  Pflanzenmaterial .....	15
2.1.3  Bakterienstämmen .....	16
2.1.4  Plasmide.....	16
2.1.5  Enzyme .....	16
2.1.6  Kits.....	17
2.1.7  Oligonukleotide .....	17
2.1.8  Software .....	17
2.2  Experimentelle Bedingungen .....	18
2.3  Aufarbeitung des Pflanzenmaterial .....	19
2.4  Extraktion der Metabolite aus dem Pflanzengewebe .....	19
2.5  Analyse der Metaboliten .....	20
2.5.1  Zuckeranalyse .....	20
2.5.2  Analyse der Ionen .....	21
2.5.3  Bestimmung des Stärkegehalts .....	22
2.6  Mikrobiologische Methoden .....	23
2.6.1  Steriles Arbeiten .....	23
2.6.2  Anzucht von <i>E.coli</i> .....	23

---

2.6.3	Herstellung und Transformation chemisch-kompetenter <i>E. coli</i> Zellen...	24
2.6.4	Herstellung von <i>E. coli</i> Dauerkulturen .....	25
2.7	Molekularbiologische Methoden .....	26
2.7.1	RNA-Isolierung .....	26
2.7.2	cDNA-Synthese .....	27
2.7.3	Primerdesign .....	27
2.7.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	28
2.7.5	Rapid Amplification of cDNA-Ends (RACE).....	29
2.7.6	Quantitative Echtzeit-PCR (qPCR) .....	32
2.7.7	Plasmidklonierung .....	35
2.7.8	Gelelektrophorese .....	37
2.7.9	Isolierung von Plasmid-DNA .....	37
2.8	mRNA <i>in-situ</i> -Hybridisierung .....	38
2.8.1	Fixieren des Gewebes .....	39
2.8.2	Dünnschnitte am Mikrotom .....	40
2.8.3	Vorbereitung der Gewebeschnitte .....	40
2.8.4	Vorbereitung auf die Sonden-Synthese .....	41
2.8.5	Sonden-Synthese.....	42
2.8.6	Hybridisierung .....	43
2.8.7	Post-Hybridisierung .....	44
2.8.8	Permanente Einbettung .....	45
2.9	Isolation und Transformation von Mesophyll Protoplasten aus <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	46
2.9.1	Isolation .....	46
2.9.2	Transformation.....	47
2.10	Statistik.....	48
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>49</b>
3.1	Saccharosetransporter-Sequenzen aus <i>Pinus sylvestris</i> .....	49
3.1.1	Identifizierung von <i>PsySUT1</i> .....	49
3.1.2	Identifizierung von <i>PsySUT2</i> .....	50
3.2	Ähnlichkeits- und Identitätsvergleiche der verschiedenen SUT .....	51
3.3	Phylogenetische Analyse .....	52
3.4	Funktionscharakterisierung von <i>PsySUT1</i> und <i>PsySUT2</i> .....	54
3.5	Organ-spezifische Expression von <i>PsySUT1</i> und <i>PsySUT2</i> .....	54

3.6	Zellspezifische Expression von <i>PsySUT1</i> und <i>PsySUT2</i> .....	56
3.6.1	Zellspezifische Expression von <i>PsySUT1</i> und <i>PsySUT2</i> in <i>source</i> -Nadeln . .....	56
3.6.2	Zellspezifische Expression von <i>PsySUT1</i> und <i>PsySUT2</i> in <i>sink</i> -Nadeln .	58
3.6.3	Zellspezifische Expression von <i>PsySUT1</i> und <i>PsySUT2</i> im Leitgewebe der Sprossachse .....	59
3.6.4	Zellspezifische Expression von <i>PsySUT1</i> und <i>PsySUT2</i> in weiblichen Zapfen .....	60
3.6.5	Zellspezifische Expression von <i>PsySUT1</i> und <i>PsySUT2</i> in männlichen Zapfen .....	62
3.7	Subzelluläre Lokalisation von <i>PsySUT1</i> und <i>PsySUT2</i> .....	63
3.8	Einfluss von Trockenstress auf den Zuckertransport in Bäumen.....	64
3.8.1	Trockenstress in <i>P. sylvestris</i> und <i>P. abies</i> .....	64
3.8.2	Expression von SUT in <i>P. sylvestris</i> und <i>P. abies</i> unter dem Einfluss von Trockenstress .....	67
3.8.3	Zucker- und Stärkegehalte in <i>P. sylvestris</i> und <i>P. abies</i> unter dem Einfluss von Trockenstress .....	68
3.8.4	Anorganische Ionen in <i>P. sylvestris</i> und <i>P. abies</i> unter dem Einfluss von Trockenstress .....	72
3.8.5	Trockenstress in <i>Q. robur</i> und <i>F. sylvatica</i> .....	74
3.8.6	Expression von SUT in <i>Q. robur</i> und <i>F. sylvatica</i> unter dem Einfluss von Trockenstress .....	77
3.8.7	Zucker- und Stärkegehalte in <i>Q. robur</i> und <i>F. sylvatica</i> unter dem Einfluss von Trockenstress .....	78
3.8.8	Anorganische Ionen in <i>Q. robur</i> und <i>F. sylvatica</i> unter dem Einfluss von Trockenstress .....	82
<b>4.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>84</b>
4.1	Identifikation von zwei Saccharosetransportern in <i>P. sylvestris</i> .....	84
4.2	Funktionscharakterisierung von SUT aus Gymnospermen – Ein Problem des <i>targeting</i> ? .....	86
4.3	<i>PsySUT1</i> – Ein Typ I SUT mit Lokalisation an der Vakuolenmembran?.....	88
4.4	Zellspezifische Expression von <i>PsySUT1</i> und <i>PsySUT2</i> .....	90
4.4.1	Mögliche Beteiligung von <i>PsySUT1</i> und <i>PsySUT2</i> an der Phloembeladung in den Nadeln .....	90
4.4.2	<i>PsySUT1</i> und <i>PsySUT2</i> könnten im Transportphloem bei der Rückgewinnung von Saccharose helfen .....	91

---

4.4.3	Eine mögliche Beteiligung von <i>PsySUT1</i> und <i>PsySUT2</i> an der Versorgung von <i>sink</i> -Geweben.....	92
4.5	Trockenstress in jeweils zwei ausgewählten Nadel- und Laubbaumarten.....	93
4.5.1	Einfluss von Trockenstress auf den Wasser- und Chlorophyllgehalt.....	93
4.5.2	Einfluss von Trockenstress auf die Expression von Saccharosetransportern .....	95
4.5.3	Einfluss von Trockenstress auf den Gehalt an Zuckern und Stärke .....	98
4.5.4	Einfluss von Trockenstress auf anorganische Ionen.....	99
<b>5.</b>	<b>Fazit und Ausblick.....</b>	<b>101</b>
5.1	Phloembeladung in <i>P. sylvetris</i> .....	101
5.2	Trockenstress in europäischen Nadel- und Laubbäumen.....	102
	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>104</b>
	<b>Anhang .....</b>	<b>120</b>
	<b>Danksagung .....</b>	<b>128</b>
	<b>Erklärung .....</b>	<b>130</b>

## Zusammenfassung

Die Beladung des Phloems mit Saccharose ist ein wesentlicher Schritt in der Verteilung von Kohlenhydraten von photosynthetisch aktivem Gewebe hin zu heterotrophen Organen einer Pflanze. Während zahlreiche Studien in krautigen Pflanzen einen aktiven Beladungsmechanismus nachgewiesen haben, wurde für Bäume grundsätzlich die passive Beladung des Phloems angenommen. Aktuelle Studien zeigen jedoch, dass es Hinweise auf die Verwendung eines aktiven Beladungsschrittes mithilfe Saccharosetransportern (SUT) in holzigen Angiospermen gibt. Auch in einigen Gymnospermen konnten schon SUT-Sequenzen isoliert werden, jedoch sind ihre Rollen im Zusammenhang mit der Phloembeladung bisher ungeklärt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei vollständige Sequenzen von SUT aus der Gymnosperme *Pinus sylvestris* (*PsySUT1* und *PsySUT2*) nachgewiesen. Mithilfe der quantitativen Echtzeit-PCR konnte die Expression beider Transporter in allen oberirdischen Organen festgestellt werden. Durch mRNA *in-situ*-Hybridisierungen wurden die Transkripte beider *SUT* in den Strasburgerzellen adulter Nadeln lokalisiert, was eine Beteiligung in der aktiven Phloembeladung vermuten lässt. Auch in der Sprossachse konnten beide *SUT* lokalisiert werden, *PsySUT1* zeigt sich in den Phloemfasern, wohingegen *PsySUT2* direkt im Phloem exprimiert wird. Sie spielen möglicherweise bei der Speicherung von Saccharose und ihrer Rückgewinnung entlang des Phloems eine Rolle. In *sink*-Gewebe, wie jungen Nadeln, sowie männlichen und weiblichen Zapfen wurde ebenfalls Transkript nachgewiesen, was für eine Beteiligung an der Entladung und der zielgerichteten Verteilung der Saccharose an Orten des Wachstums spricht. Die biochemische Charakterisierung der Transporter hinsichtlich ihrer Funktion war bisher noch nicht erfolgreich.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde der Einfluss von Trockenstress auf den Zuckertransport in zwei Nadelbaumarten, *P. sylvestris* und *P. abies*, und zwei Laubbaumarten, *Q. robur* und *F. sylvatica*, untersucht. Bei allen Bäumen zeigte sich eine deutliche Abnahme im Stärkegehalt, die mit einer Zunahme im Hexosegehalt einhergeht. Die Expression der verschiedenen *SUT* zeigte sich unter dem Einfluss von Trockenstress mit einer nicht einheitlichen Reaktion. So konnten sowohl eine Hoch- als auch eine Runterregulierung der *SUT* gemessen werden, als auch eine unveränderte Expression bei einigen Transportern. Ein direkter Zusammenhang zwischen der *SUT*-Expression und dem Zucker- und Stärkegehalt ist demnach nicht erkennbar.

## 1. Einleitung

Als autotrophe Organismen decken Bäume ihren Kohlenstoffbedarf durch die Photosynthese. Bei diesem Prozess, der im Mesophyll der Blätter stattfindet, werden durch die Fixierung von Kohlendioxid energiereiche Kohlenhydrate aufgebaut. Um Gewebe zu versorgen, die keine photosynthetische Aktivität aufweisen, werden die Kohlenhydrate im Phloem von dem Gewebe der Produktion zu den Geweben des Verbrauchs transportiert. Hierbei wird vorwiegend die chemisch inerte Saccharose als Transportform verwendet. Für den Transport und die Weiterleitung von Wasser wird das Xylem benötigt, dabei wird das Wasser von den Wurzeln aufgenommen und über die Sprossachse bis in die Blätter transportiert. Zusammen bilden Phloem und Xylem Leitbündel, die sich über die gesamte Pflanze erstrecken.

### 1.1 Aufbau und Funktion des Phloems

Zufolge seiner unterschiedlichen Funktionen kann das Phloem in Sammelpfloem, Transportphloem und Abgabephloem unterteilt werden. Das Sammelpfloem befindet sich in den photosynthetisch aktiven *source*-Organen einer Pflanze, also den ausgewachsenen Blättern, hier wird das Phloem mit Assimilaten beladen. Das Transportphloem dient dem Langstreckentransport der im Phloemsaft gelösten Assimilate und im Abgabephloem werden die Assimilate aus dem Phloem an das umliegende *sink*-Gewebe abgegeben (van Bel, 1996). Zu den *sinks* zählen alle heterotrophen Organe, wie Wurzeln, Blüten oder Früchte.

Im Laufe der Evolution hat sich das Phloem weiterentwickelt, weshalb es innerhalb der Samenpflanzen grundlegende Unterschiede in der Phloemanatomie in Bezug auf Zellgröße, -form und -vernetzung gibt (Hartig, 1837). Nicht nur einzelne Gewebe, sondern auch ganze Organismen haben sich weiterentwickelt. So lassen sich Bäume entweder der Klasse der Gymnospermen oder der Angiospermen zuordnen. Die Gymnospermen, oder Nacktsamer, gehören zu den ursprünglichen Samenpflanzen (Bresinsky *et al.*, 2008). Ihr Name beschreibt bereits ein wesentliches Merkmal der Gymnospermen, ihre Samenanlagen sind nicht in einem Fruchtknoten eingeschlossen. Die Gymnospermen lassen sich in fünf Gruppen einteilen, wobei die zapfentragenden Nadelbäume, die Koniferen, mit 614 Arten die größte Gruppe darstellen (Christenhusz *et al.*, 2011). Demgegenüber stehen die Angiospermen, die auch Bedecktsamer genannt werden. Bei Vertretern dieser Pflanze ist die Samenanlage innerhalb der Blüte in einem

Fruchtknoten eingeschlossen (Bresinsky *et al.*, 2008). Zu den zwei größten Gruppen der Angiospermen zählen die Eudikotyledonen und die Monokotyledonen. Die beiden Gruppen wurden nach der Anzahl ihrer Keimblätter benannt, während Monokotyledonen nur ein Keimblatt besitzen, zeigen Eudikotyledonen bei der Keimung zwei Keimblätter (Palmer *et al.*, 2004).

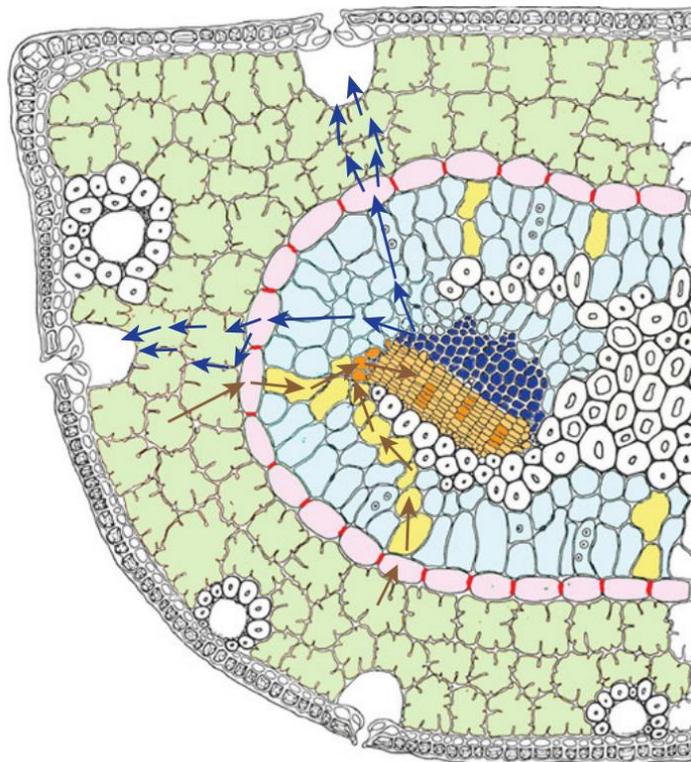
### **1.1.1 Aufbau des Phloems in Angiospermen**

In Angiospermen setzt sich das Phloem aus Siebelementen und Geleitzellen zusammen und bilden gemeinsam die funktionelle Einheit des Siebelement-Geleitzellen-Komplex. In den Siebelementen, oder auch Siebröhren genannt, die sich aus einzelnen Siebröhrenzellen zusammensetzen, findet der Phloemtransport statt. Verbunden sind die Siebröhrenzellen an ihren Endwänden durch Siebplatten, die Poren mit besonders großem Durchmesser (bis zu 15  $\mu\text{m}$ ) aufweisen (Evert *et al.*, 2009). Kennzeichnend für die Siebelemente sind außerdem das Fehlen von Zellkern und Vakuole. Organellen wie Mitochondrien sind nur in sehr geringer Stückzahl zu finden und es wird vermutet, dass sie eine eingeschränkte Funktionalität besitzen (van Bel und Knoblauch, 2000). Über lateral gelegene Siebfelder sind die Siebelemente mit den Geleitzellen assoziiert. Im Gegensatz zu den Siebelementen sind die Geleitzellen reich an Mitochondrien und besitzen einen großen Zellkern. Zu den Aufgaben der Geleitzellen gehört die Versorgung mit Metaboliten und die Beladung der Siebelemente (van Bel, 2003a). Dabei werden nicht nur Zucker, sondern auch Aminosäuren, anorganische Ionen, Nukleinsäuren und Proteine im Phloem transportiert (Ohshima *et al.*, 1990; Byrne und Miller, 1990; Atkins *et al.*, 2011). Siebelement und Geleitzelle entspringen einer Vorläuferzelle, durch eine asymmetrische Teilung haben sich die kleine Geleitzelle und das größere Siebröhrenelement gebildet (Esau, 1969).

### **1.1.2 Aufbau des Phloems in Gymnospermen**

Im Phloem von Gymnospermen findet man Zellen mit einer ähnlichen Funktion wie die Zellen im Phloem von Angiospermen, jedoch sind sie morphologisch deutlich anders gestaltet. Der Langstreckentransport der Assimilate findet in den Siebzellen statt, die analog zu den Siebelementen der Angiospermen sind. Siebzellen sind deutlich länger und schmaler verglichen mit Siebelementen (Crang *et al.*, 2019). Sie laufen an ihren Enden spitz zu und stehen dort überlappend miteinander in Kontakt, dabei sind die Poren in den Endwänden und die Poren in den lateralen Wänden gleichartig ausdifferenziert (Evert *et*

*al.*, 2009). Im Gegensatz zu den Angiospermen sind die Siebporen der Gymnospermen mit tubulärem endoplasmatischem Retikulum (ER) durchzogen (Schulz, 1992). Siebzellen haben keine benachbarten Geleitzellen, sondern sind mit Strasburgerzellen assoziiert. Strasburgerzellen übernehmen die Rolle von Geleitzellen, sie sind für die Versorgung der Siebzellen mit Metaboliten verantwortlich und spielen eine Rolle in der Phloembeladung. Anders als bei den Angiospermen entspringen Siebzellen und Strasburgerzellen nicht einer gemeinsamen Mutterzelle (Evert *et al.*, 2009).



**Abbildung 1: Schematische Zeichnung der verschiedenen Zelltypen und Transportwege im Nadelquerschnitt von *P. sylvestris*.** Der *pre-phloem pathway* (braune Pfeile) beginnt mit dem Transport der Photoassimilate vom Mesophyll (grün), über die Bündelscheide (rosa) und durch das Transfusionsparenchym (gelb) zu den Strasburgerzellen (dunkles orange), um von dort aus in die Siebzellen (helles orange) geladen zu werden. Der *post-xylem pathway* transportiert Wasser vom Xylem (dunkles blau) durch die Transfusionsstracheiden (helles blau) und die Bündelscheide zum Mesophyll, wo es schließlich in den substomatalen Kammern zur Transpiration abgegeben werden kann. Ausschnitt aus einer Abbildung nach Liesche *et al.* (2011b).

In den Blättern von Gymnospermen ist das Leitgewebe, welches sich aus Phloem und Xylem zusammensetzt, in das charakteristische Transfusionsgewebe eingebettet (Abbildung 1). Das Transfusionsgewebe besteht aus zwei verschiedenen Zelltypen, den Transfusionsstracheiden und dem Transfusionsparenchym.

Transfusionsstracheiden sind tote, verholzte Zellen, die auf den Wassertransport spezialisiert sind (Canny, 1993). Je nach Grad der Zellwandmodifikationen und der Morphologie der Tüpfel gibt es auch Transfusionsstracheiden, die für die

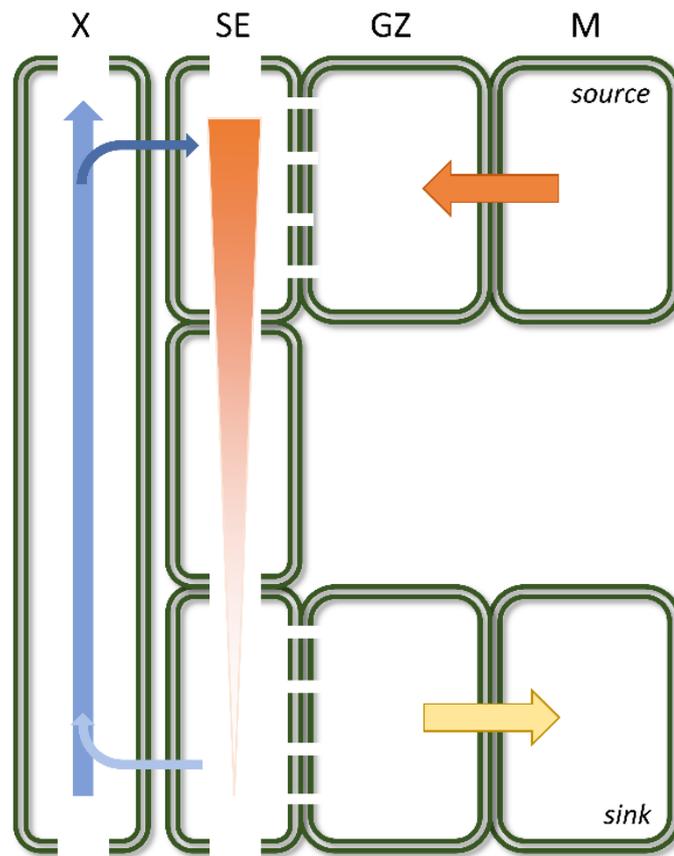
Wasserspeicherung und -versorgung wichtig sind. Tüpfel sind dabei Hohlräume in der Sekundärwand zweier angrenzender Zellen, die den Wasser- und Stoffaustausch trotz verdickter Zellwand erlauben (Evert *et al.*, 2009). Darüber hinaus bieten die lignifizierten Zellen Stabilität und können auch bei sehr trockenen Bedingungen ihre Form beibehalten (Gadek und Quinn, 1988).

Im Gegensatz zu den Transfusionstracheiden gehören die Zellen des Transfusionsparenchym zu den lebenden Zellen. Sie verbinden die Bündelscheide mit den am Rand des Phloems gelegenen Strasburgerzellen (Abbildung 1). Damit gehören sie zum *pre-phloem pathway*, der den Weg der Photoassimilate vom Mesophyll zum Phloem beschreibt.

Die Bündelscheide ist wiederum eine Zelllage, die das Transfusionsgewebe vom Mesophyll abgrenzt. Durch eine Suberinisierung und/oder Lignifizierung der Radial- und Querwände reguliert die Bündelscheide den Austausch von Assimilaten und Wasser zwischen den photosynthetisch aktiven und den vaskulären Geweben (Evert *et al.*, 2009). In den Nadeln der Pinaceae befindet sich in der Bündelscheide eine besondere Suberinisierung der Radialwände, die als Casparischer Streifen bezeichnet wird (rote Kennzeichnung in Abbildung 1). Durch die so entstandene apoplastische Barriere wird für die Bündelscheide eine wichtige Rolle bei der Trockenheitsresistenz und der Frosttoleranz vermutet (Soar, 1922; Kaku, 1971).

### 1.1.3 Transport im Phloem

Die Grundlage für den Langstreckentransport im Phloem stellt der osmotische Druck zwischen dem *source*- und dem *sink*-Gewebe dar, die von Münch (1930) als Druckstromtheorie beschrieben wurde. Durch die stetige Beladung des Phloems in photosynthetisch aktivem Gewebe und das Entladen der Assimilate aus dem Phloem zu Geweben des Bedarfs wird ein Konzentrationsgradient aufrechterhalten, der den Transportstrom antreibt. Die treibende Kraft ist hierbei der hydrostatische Druck, der durch das einströmende Wasser aus dem Xylem entsteht (Abbildung 2). Das Transportphloem versorgt nicht nur terminal gelegene *sink*-Gewebe, sondern auch heterotrophe Gewebe, die entlang des Transportweges liegen. Um den Druckstrom trotz der Abgabe von Assimilaten aufrecht zu erhalten, muss die Saccharose entlang des Transportphloems aktiv wieder ins Phloem geladen werden (Hafke *et al.*, 2005).



**Abbildung 2: Schematische Darstellung der Druckstromtheorie nach Münch (1930).** Die im Mesophyll (M) synthetisierten Transportzucker werden über die Geleitzellen (GZ) in die Siebelemente (SE) des Phloems geladen (orangener Pfeil). Durch den hohen osmotischen Druck strömt Wasser aus dem Xylem (X) in die Siebelemente (dunkelblauer Pfeil). Der so entstandene hydrostatische Druck in den Siebelementen sorgt für einen Massenstrom in Richtung der *sinks*. Durch die Entladung der Zucker in die *sink*-Gewebe (gelber Pfeil) nimmt die Konzentration der Transportzucker so weit ab, dass das Wasser durch Osmose wieder ins Xylem austritt (hellblauer Pfeil). Durch den so entstandenen Konzentrationsgradienten in den Siebelementen wird der Transportstrom aufrechterhalten.

Der Transportmechanismus im Phloem von Gymnospermen ist noch nicht ausreichend erforscht. Die Ansammlungen von ER in den Siebzellen sorgen für einen höheren Transportwiderstand verglichen mit den offenen, großen Siebporen der Siebelemente in den Angiospermen (Schulz, 1992). Zudem stellt sich die Frage, ob ein einziger Druckgradient bei hohen Gewächsen wie Bäumen zwischen *source*- und *sink*-Gewebe die treibende Kraft für einen effizienten Phloemtransport sein kann. Es wird angenommen, dass Gymnospermen, genau wie Angiospermen, energieabhängige Schritte entlang des Transportphloems nutzen, um den Stofftransport aufrechtzuerhalten (Schulz, 1992). Welche Rolle das ER bei der Be- und Entladung des Phloems spielt, ist bisher nicht bekannt (Liesche und Schulz, 2018).

## 1.2 Mechanismen der Phloembeladung

Der erste Schritt im Transport von Saccharose aus dem Mesophyll ins Sammelphloem wird als Phloembeladung bezeichnet. Dabei wurden drei Beladungsmechanismen beschrieben, die sich hinsichtlich verschiedener Bedingungen unterscheiden, bei denen es sich um folgende Mechanismen handelt:

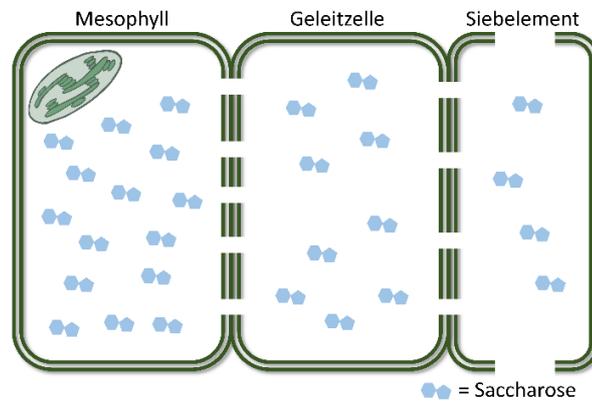
- Passive Beladung durch Diffusion (Turgeon und Medville, 1998)
- Aktive symplastische Beladung durch *polymer trapping* von Raffinose-Oligosacchariden (RFO) (Turgeon, 1991)
- Aktive apoplastische Beladung mithilfe von Saccharosetransportern (Riesmeier *et al.*, 1992)

So sind für die Identifikation des Beladungsmechanismus die Anatomie der Geleitzellen, die Anzahl der Plasmodesmen (Gamalei, 1989), der transportierte Zucker (Zimmermann und Ziegler, 1975), ein Konzentrationsgradient des zu transportierenden Zuckers zwischen Mesophyll und Phloem (Lohaus *et al.*, 1995; Nadwodnik und Lohaus, 2008) und die Beteiligung von Saccharosetransportern (Sauer und Stolz, 1994) entscheidend.

### 1.2.1 Passive Phloembeladung

Die passive Phloembeladung gilt als ursprünglichste und einfachste Form der Phloembeladung (De Schepper *et al.*, 2013). Die Voraussetzungen für den passiven Transport sind dabei eine hohe Dichte an Plasmodesmen entlang des *pre-phloem pathways* und die Verwendung von Saccharose als Transportzucker (Rennie und Turgeon, 2009; Fu *et al.*, 2011). Dabei diffundiert die Saccharose von ihrem Produktionsort, dem Cytosol der Mesophyllzellen, entlang eines Konzentrationsgradienten über die Plasmodesmen durch die Geleitzellen in die Siebelemente des Phloems (Abbildung 3; Turgeon und Medville, 1998). Der erste experimentelle Nachweis von passiver Beladung des Phloems bei Bäumen wurde durch Plasmolyse-Versuche an der Trauerweide *Salix babylonica* erbracht (Turgeon und Medville, 1998). Dabei plasmolysierten die Zellen des Phloems bei ähnlichen Konzentrationen wie die Zellen des umliegenden Mesophylls, wohingegen bei aktiven Beladern das Phloem deutlich höhere Konzentrationen des Osmotikums brauchte, um die Plasmolyse zu induzieren. Für viele weitere Bäume wie zum Beispiel Pappel, Apfel, Birne, Walnuss aber auch Kiefer, die zu den Gymnospermen gehört, wird bislang ein

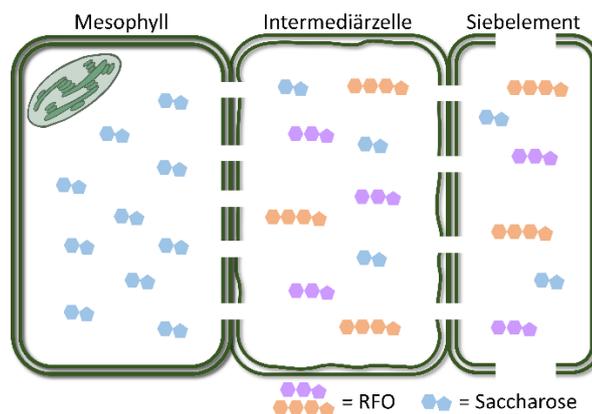
passiver Beladungsmechanismus angenommen (Turgeon und Medville, 1998; Fu *et al.*, 2011; Liesche, 2017).



**Abbildung 3: Schematische Darstellung der passiven Phloembeladung.** Die Saccharose (blau) diffundiert entlang ihres Konzentrationsgradienten durch die zahlreichen plasmodesmatischen Verbindungen von den Mesophyllzellen über die Geleitzellen in die Siebelemente des Phloems, wo sie schließlich dem Langstreckentransport zur Verfügung steht.

### 1.2.2 Symplastische Beladung durch *polymer trapping*

In einigen Pflanzenfamilien, vornehmlich bei Cucurbitaceae, Onagraceae und Oleaceae, konnten spezielle Geleitzellen, die sogenannten Intermediärzellen, gefunden werden (Zhang und Turgeon, 2018). Pflanzen mit diesen speziellen Geleitzellen werden als symplastische Belader charakterisiert, da die Anwesenheit von Intermediärzellen immer mit einem großen Vorkommen der Zucker Raffinose und Stachyose im Phloemsaft einhergeht (Turgeon *et al.*, 1993; Turgeon, 1996).

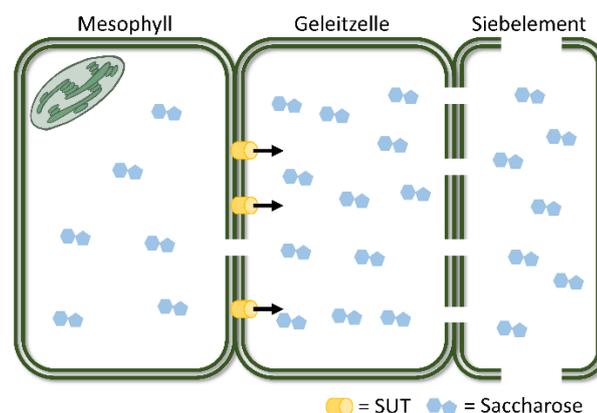


**Abbildung 4: Schematische Darstellung des *polymer trap* Modells.** Die Saccharose (blau) gelangt symplastisch in die Intermediärzellen und wird dort zu Oligosaccharide der Raffinosefamilie (RFO; lila: Raffinose, violett: Stachyose) synthetisiert. Aus den Intermediärzellen gelangen die RFO in die assoziierten Siebelemente.

Bei dieser Beladungsmethode gelangt die Saccharose symplastisch durch Plasmodesmen in die Intermediärzellen. Dort wird die Saccharose in größere Oligosaccharide der Raffinosefamilie (RFO) wie Raffinose und Stachyose umgesetzt (Abbildung 4). Aufgrund ihrer Molekülgröße können die RFO nicht zurück in die Mesophyllzellen diffundieren, weshalb dieser Beladungsmechanismus auch das *polymer trap* Modell genannt wird (Turgeon und Beebe, 1991; Voitsekhovskaja *et al.*, 2006). Dabei werden im Phloem höhere Zuckerkonzentrationen im Vergleich zu den Mesophyllzellen erzeugt (Voitsekhovskaja *et al.*, 2006), weswegen dieser Beladungsmechanismus auch als aktive Beladung angesehen wird (Slewinski *et al.*, 2013).

### 1.2.3 Apoplastische Beladung durch Saccharosetransporter

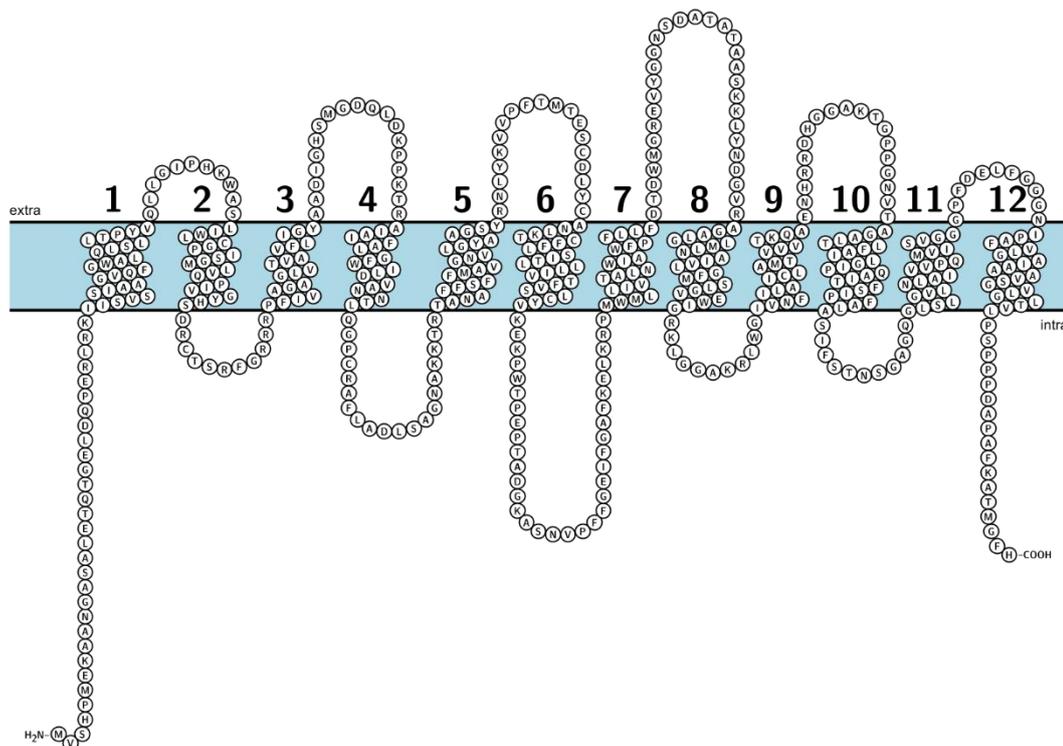
Bei Pflanzenarten mit symplastisch isolierten Geleitzellen muss die Saccharose, die im Mesophyll produziert wird, den apoplastischen Transportweg nutzen. Hierbei wird die Saccharose zunächst mithilfe von speziellen Transportern, den sogenannten SWEET (*Sugars Will Eventually be Exported Transporters*), aus dem Mesophyll in den Apoplasten exportiert (Chen *et al.*, 2012). Die Aufnahme von Saccharose aus dem Apoplasten in die Geleitzellen erfolgt mithilfe der membranständigen SUT (Abbildung 5). SUT sind protonenabhängige Saccharosetransporter, die den Protonengradienten nutzen, um Saccharose gegen einen Konzentrationsgradienten in Zellen zu transportieren (Lalonde *et al.*, 2003; Julius *et al.*, 2017). In die Geleitzellen aufgenommen kann die Saccharose in die Siebelemente diffundieren, wo sie dem Langstreckentransport zur Verfügung steht.



**Abbildung 5: Schematische Darstellung der aktiven apoplastischen Phloembeladung.** Durch die symplastische Isolierung von Mesophyll und Geleitzelle wird die Saccharose (blau) zunächst in den Apoplasten exportiert und von dort durch SUT (gelb) gegen einen Konzentrationsgradienten in die Geleitzellen aufgenommen. Durch Diffusion gelangt die Saccharose von den Geleitzellen in die Siebelemente.

### 1.3 Struktur und Funktion von Saccharosetransportern

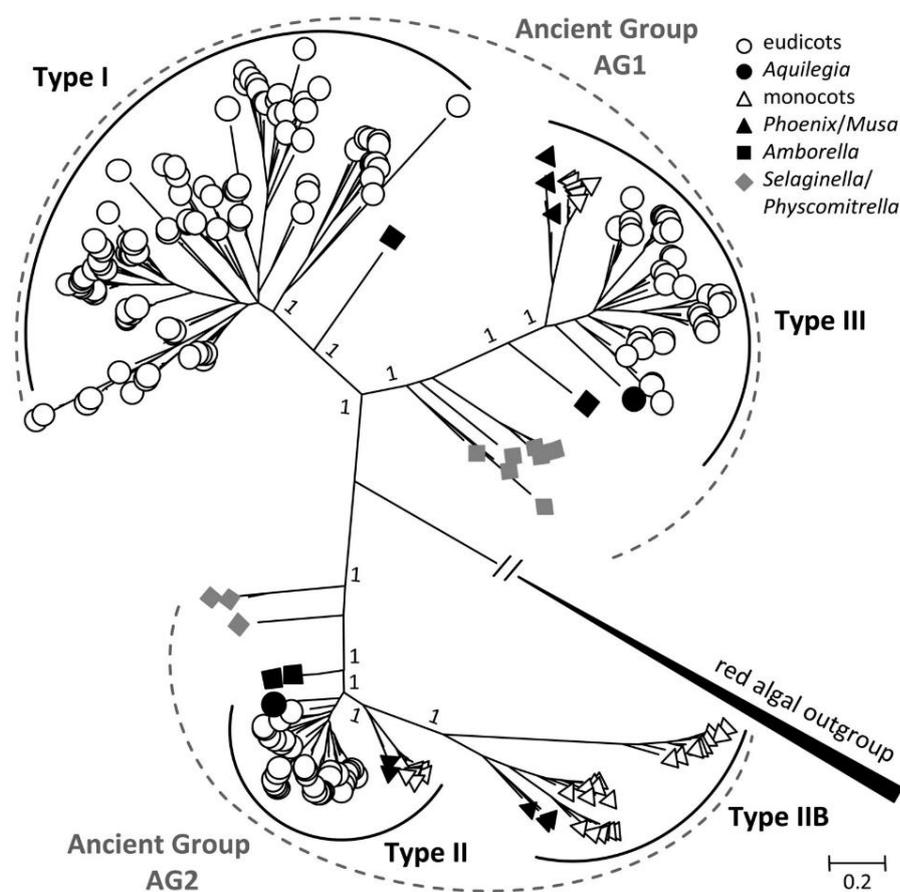
Die Transportproteine, die an dem energieabhängigen Transfer von Saccharose beteiligt sind, werden als SUT (*sucrose uptake transporter*) oder SUC (*sucrose uptake carrier*) bezeichnet. SUT sind membranständige Proteine, die funktional zu den glycosid-pentosid-hexuronid (GPH)- Symportern gehören, die sich zu der übergeordneten Gruppe der *major facilitator superfamily* (MFS) zuordnen lassen (Marger und Saier, 1993). SUT transportieren Saccharose im Symport mit Protonen aus dem Apoplasten über die Plasmamembran in das Zellinnere (Bush, 1990). Im Schnitt setzen sich die SUT aus 500 bis 600 Aminosäuren zusammen, die als 12  $\alpha$ -helikale membranspannende Domänen angeordnet sind (Williams *et al.*, 2000). Zwischen der 6. und der 7. Transmembrandomäne befindet sich ein zentraler cytoplasmatischer *loop* und auch der N- und C-terminale Teil der SUT ragen ins Zellinnere (Stolz *et al.*, 1999).



**Abbildung 6: Topologievorhersage für AtSUC2.** Dargestellt ist ein Strukturmodell des Typ I Transporters AtSUC2 aus der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* (CAA53150, Sauer und Stolz, (1994)). Der typische Aufbau aus 12  $\alpha$ -helikalen Transmembrandomänen zeigt sich am Beispiel des AtSUC2. Sowohl der N- und C-terminale Teil als auch der zentral zwischen den Domänen 6 und 7 gelegene *loop* liegen im Cytoplasma. Erstellt wurde die Abbildung mithilfe von dem Proteindatenanalyse-Tool Protter (Omasits *et al.*, 2014).

Die erste cDNA eines Saccharosetransporters wurde aus Spinat (*Spinacia oleracea*) von Riesmeier *et al.* (1992) isoliert und durch die heterologe Expression in Hefe charakterisiert. Seitdem wurden sowohl in krautigen Pflanzen als auch in Bäumen

zahlreiche weitere SUT isoliert und charakterisiert (Lalonde *et al.*, 1999; Lemoine, 2000; Decourteix *et al.*, 2006; Tang *et al.*, 2010; Payyavula *et al.*, 2011; Öner-Sieben *et al.*, 2015; Dobbstein *et al.*, 2018; Han *et al.*, 2022). Durch phylogenetische und biochemische Untersuchungen konnten die identifizierten Transporter in Gruppen unterteilt werden, die durch eine uneinheitliche Nomenklatur jedoch oft unterschiedlich ausfiel (Sauer, 2007; Braun und Slewinski, 2009; Reinders *et al.*, 2012; Peng *et al.*, 2014). Die in dieser Arbeit angewandte Einteilung der Gruppen orientiert sich an der Nomenklatur nach Peng *et al.* (2014), die die SUT in vier Gruppen (Typ I, II, IIB und III) einteilt (Abbildung 7).



**Abbildung 7: Phylogenetische Einteilung der SUT aus 41 sequenzierten Pflanzengenomen.** Aus den zwei ursprünglichen Gruppen AG1 und AG2 haben sich vier deutlich distinkte Typen (I, II, IIB; III) entwickelt. Dabei gelten der Typ II und der Typ III als evolutionär konserviert und man findet sie sowohl bei Monokotyledonen als auch bei Eudikotyledonen. Der Typ I kommt nur in eudikotyledonen Pflanzen vor, wohingegen der Typ IIB nur in monokotyledonen Pflanzen gefunden werden konnte. Die Sequenz der Rotalge *Galdiera sulphuraria* dient hier als Außengruppe. Abbildung aus Peng *et al.* (2014).

Bei den SUT des Typ I handelt es sich um hochaffine Saccharosetransporter, die bisher nur in Eudikotyledonen nachgewiesen werden konnten. Zusammen mit dem Typ III ist der Typ I aus der gemeinsamen ursprünglichen Gruppe AG1 (*ancient group 1*) hervorgegangen, wobei phylogenetische Analysen gezeigt haben, dass der Typ I sich aus

dem Typ III weiterentwickelt hat (Reinders *et al.*, 2012; Peng *et al.*, 2014). Sie werden aufgrund ihrer Lokalisation an der Plasmamembran im Phloem mit der Phloembeladung in Verbindung gebracht (Riesmeier *et al.*, 1994; Gottwald *et al.*, 2000). Darüber hinaus sind Typ I Transporter auch an der Rückgewinnung von ausgetretener Saccharose entlang des Transportphloems beteiligt und spielen eine Rolle in der Entwicklung von Pollen und Früchten (Minchin und Thorpe, 1987; Kühn *et al.*, 2003; Sivitz *et al.*, 2008; Kühn und Grof, 2010).

Typ III SUT konnten bisher sowohl in Monokotyledonen als auch in Eudikotyledonen identifiziert werden. Sie kommen hauptsächlich an der Vakuolenmembran vor und spielen eine Rolle in der Regulation des cytosolischen Saccharosehaushalts, indem sie den Export von Saccharose aus der Vakuole vermitteln (Endler *et al.*, 2006; Reinders *et al.*, 2008; Payyavula *et al.*, 2011; Schneider *et al.*, 2012). In Vertretern der Solanaceae konnte die Lokalisation von SUT des Typ III auch an der Plasmamembran beobachtet werden. Hier wird vermutet, dass sie an saccharoseabhängigen Signalübertragungswegen beteiligt sind, die mit der Licht- und Hormonwahrnehmung assoziiert sind (Chincinska *et al.*, 2008; Chincinska *et al.*, 2013).

Aus der ursprünglichen Gruppe AG2 sind die SUT des Typ II hervorgegangen. Sie konnten bisher in jedem untersuchten Pflanzengenom nachgewiesen werden, darunter auch in primitiven Pflanzen wie den nicht vaskulären Landpflanzen (*Physcomitrella*) und den vaskulären, nicht samenbildenden Landpflanzen (*Selaginella*) (Reinders *et al.*, 2012). Im Vergleich zu den SUT der anderen beiden Typen ist der zentral im Protein gelegene cytoplasmatische *loop* von SUT des Typ II deutlich länger. Aufgrund des längeren *loops*, aber auch einer geringeren Substrataffinität wurde eine Funktion als Saccharose-Sensor angenommen, die jedoch noch nicht belegt werden konnte (Barker *et al.*, 2000; Kühn, 2003; Sauer, 2007; Braun und Slewinski, 2009). Durch ihre Lokalisation im Phloem wie auch in *sink*-Gewebe wird ihnen eine Beteiligung bei der Phloembeladung und dem Import von Saccharose in heterotrophe Gewebe zugeschrieben (Aoki *et al.*, 2003; Kühn und Grof, 2010; Lalonde und Frommer, 2012).

Als weitere distinkte Gruppe hat sich der Typ IIB entwickelt. SUT des Typ IIB kommen ausschließlich in Monokotyledonen vor (Sauer, 2007). Es handelt sich um hochaffine Transporter, die in der Plasmamembran lokalisiert sind und im Gegensatz zu den SUT des Typ II keinen längeren zentralen *loop* aufweisen. Durch ihre funktionelle und

strukturelle Ähnlichkeit zu den SUT des Typ I aus Eudikotyledonen übernehmen sie die Rolle der Phloembeladung in Monokotyledonen (Braun und Slewinski, 2009).

#### **1.4 Trockenstress in Bäumen**

Die Auswirkungen des Klimawandel zeigen sich deutlich an immer häufigeren und längeren Trockenheitsperioden weltweit (Dai, 2013), die vor allem die Wälder am stärksten betreffen. So gilt Trockenstress als Hauptursache für das Absterben der betroffenen Bäume (Allen *et al.*, 2010; Allen *et al.*, 2015). Im Gegensatz zu einjährigen Pflanzen sind Bäume langlebige Arten, die darauf angewiesen sind, sich den klimatischen Bedingungen anzupassen, um zu überleben. Zwei physiologische Mechanismen, die für das Absterben von Pflanzen unter Trockenstress verantwortlich sind, sind das hydraulische Versagen und der Kohlenstoffmangel (McDowell *et al.*, 2008). Beim hydraulischen Versagen ist der Wasserverlust durch offene Stomata deutlich höher als die Wasseraufnahme durch die Wurzeln, sodass es zu Embolien im Xylem kommt und so der kontinuierliche Wasserfluss durch das Leitgewebe abbricht, was Welke und schließlich das Absterben vom betroffenen Gewebe bedeutet. Pflanzen, die bei Trockenheit ihre Stomata länger geöffnet halten, werden auch als anisohydrisch bezeichnet (Tardieu und Simonneau, 1998). Im Gegensatz dazu gibt es Pflanzen mit isohydrischer Reaktion auf Trockenstress, sie schließen die Stomata früh, sobald sich das Wasserpotenzial des Bodens verringert, um den Wasserverlust zu minimieren (Jones, 1998). Durch die fehlende Transpiration erliegt jedoch auch die Photosynthese, sodass der Bedarf an Kohlenstoff nur durch gespeicherte Kohlenhydrate gedeckt werden kann, bis diese erschöpft sind. Ist der Bedarf an Kohlenstoff höher als die Versorgung wird die Pflanze am Kohlenstoffmangel sterben (Tardieu und Simonneau, 1998).

Neben dem Xylem ist auch das Phloem vom Trockenstress betroffen, da beide Gewebe hydraulisch miteinander verbunden sind (Thompson und Holbrook, 2003). Bei einem abnehmenden Wasserpotenzial im Xylem ist die Versorgung des Phloems mit Wasser vermindert. Um eine adäquate Wasseraufnahme ins Phloem zu gewährleisten muss die Zuckerkonzentration im Phloem erhöht werden, um den osmotischen Druck zu erhöhen, jedoch wird dadurch auch die Viskosität des Phloensafts beeinflusst (Sevanto, 2014, 2018; Salmon *et al.*, 2019). Trockenstress hat also direkten Einfluss auf die Menge an transportiertem Kohlenstoff und die Transportrate (Ruehr *et al.*, 2009), somit ist auch die Verteilung von Nähr-, Abwehr- und Signalstoffen, die im Phloem stattfindet, betroffen (van Bel, 2003a). Um ungünstigen abiotischen Faktoren wie Trockenstress standhalten

zu können, müssen Bäume ihren Stoffwechsel kurzfristig anpassen, was durch die Regulation der Transkription verschiedenster Gene gewährleistet werden kann. In bisherigen Studien konnte eine Änderung in der Expression von SUT unter Trockenstress bei vielen Mono- und Dikotyledonen festgestellt werden (Ibraheem *et al.*, 2011; Frost *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2018). Unter den Dikotyledonen wurden jedoch größtenteils krautige Pflanzen untersucht, während sich die Erkenntnisse bei Bäumen auf den vakuolenmembran-lokalisierten PtaSUT4 aus der Pappel (*Populus*) beschränkt (Frost *et al.*, 2012). Die Auswirkungen der Expressionsänderungen auf die Saccharoseverteilung und die genauen molekularen Mechanismen sind jedoch noch weitestgehend unerforscht.

## 1.5 Fragestellung

Die Beladung des Phloems mit Photoassimilaten ist ein wesentlicher Schritt in der Versorgung mit Kohlenhydraten. Die meisten Studien zur Untersuchung der verschiedenen Phloembeladungs-Mechanismen wurden bisher größtenteils an krautigen Pflanzen durchgeführt, da diese eine kurze Generationszeit haben und schnelle Wachstumsraten aufweisen. Für Bäume wurde anhand ihrer Anatomie und der verhältnismäßig hohen Saccharosekonzentration in den Blättern lange Zeit ein passiver Beladungsmechanismus angenommen, jedoch zeigte die Identifizierung von Saccharosetransporter-Sequenzen sowohl in holzigen Angiospermen als auch in Gymnospermen Hinweise auf eine mögliche Beteiligung am aktiven Zuckertransport. Auch für die Gymnosperme *P. sylvestris* wird bisher die passive Phloembeladung angenommen, da bis zum jetzigen Zeitpunkt noch keine Saccharosetransporter-Sequenzen identifiziert wurden. Im Rahmen dieser Arbeit soll der Zuckertransport und der Phloembeladungs-Mechanismus von *P. sylvestris* näher untersucht werden. Dazu ergaben sich folgende Fragestellungen:

Sind Saccharosetransporter in der Gymnosperme *P. sylvestris* exprimiert? Und wenn ja:

- Welchem Typ können die gefundenen Transporter zugeordnet werden?
- In welchen Organen werden sie exprimiert?
- In welchen Zellen werden sie exprimiert?
- Wie sieht die subzelluläre Lokalisation aus?
- Welche biochemischen Eigenschaften besitzen die Transporter?

Im zweiten Teil der Arbeit wird der Einfluss von Trockenstress auf den Zuckertransport untersucht. Trockenheit ist ein kritischer abiotischer Faktor, der sich auf molekularer und

metabolischer Ebene negativ auf das Wachstum und die Entwicklung von Pflanzen auswirkt. Die Phloembeladung und der Transport von Saccharose von *source*- zu *sink*-Gewebe wird durch den Wasserstatus der Pflanze beeinflusst. Dabei ist Saccharose die primäre Energiequelle für Pflanzen und wird außerdem auch als wichtiges Signalmolekül und Osmolyt benötigt. Es kommt also die Frage auf, inwieweit sich Trockenstress auf den Zuckertransport und die Expression von Saccharosetransportern auswirkt. Für die Versuche wurden zwei Vertreter der Pinaceae (*P. sylvestris* und *P. abies*) und zwei Vertreter der Fagaceae (*Q. robur* und *F. sylvatica*) ausgewählt.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien und Geräte

Eine detaillierte Auflistung aller verwendeten Laborgeräte und Chemikalien mit Reinheitsgrad und ihren Bezugsquellen befindet sich im Anhang.

#### 2.1.2 Pflanzenmaterial

Die in dieser Arbeit untersuchten Bäume sind vier verschiedene Baumarten aus zwei verschiedenen Pflanzenfamilien (Tabelle 1). Die Bäume für das Trockenstressexperiment (Kapitel 2.2) wurden als 3-jährige Setzlinge von der Baumschule Eggert (Vaale, Deutschland) bezogen und in einem offenen Kaltgewächshaus auf dem Campus der Universität Wuppertal gehalten. Das Dach des Gewächshauses bestand aus UV-durchlässigem Plexiglas. Durch Seitenwände aus engmaschigem Draht wurde eine optimale Luftzirkulation gewährleistet, während die Pflanzen vor Niederschlag geschützt waren.

**Tabelle 1: Untersuchte Baumarten**

<b>Art</b>	<b>Trivialname</b>	<b>Familie</b>	<b>Klasse</b>	<b>Erstbestimmer</b>
<i>Quercus robur</i>	Stieleiche	Fagaceae	Angiospermae	Linné (L.)
<i>Fagus sylvatica</i>	Rotbuche	Fagaceae	Angiospermae	Linné (L.)
<i>Picea abies</i>	Gemeine Fichte	Pinaceae	Gymnospermae	Karst (H.KARST)
<i>Pinus sylvestris</i>	Waldkiefer	Pinaceae	Gymnospermae	Linné (L.)

Für Gewebeschnitte wurden sowohl 3-jährige Setzlinge als auch ein ausgewachsenes Exemplar von *Pinus sylvestris*, welches sich innerhalb des universitären Arboretums befand, beprobt.

Zur Isolation von pflanzlichen Protoplasten wurde die Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* des Ökotypen „Columbia-0“ verwendet. Anders als die Bäume wurde *A. thaliana* in einem geschlossenen Gewächshaus mit einem automatischen Beleuchtungs- und Heizungssystem herangezogen. Der Tag-Nacht-Rhythmus beinhaltet 14 Stunden Tageslicht bei 25 °C gefolgt von 10 Stunden Dunkelheit bei einer Umgebungstemperatur von 18 °C. Die Pflanzen wurden regelmäßig gewässert.

### 2.1.3 Bakterienstämme

Zur Klonierung und der Vervielfältigung von Plasmiden mit und ohne Insert wurde der Stamm *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  verwendet.

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

### 2.1.4 Plasmide

In Tabelle 2 sind die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide aufgeführt.

**Tabelle 2: Verwendete Plasmide**

Vektor	Selektionsmarker	Referenz
pGEM-T easy	Ampicillin, X-Gal	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)

### 2.1.5 Enzyme

Tabelle 3 listet die verwendeten Enzyme auf.

**Tabelle 3: Verwendete Enzyme**

Enzym	Firma
$\alpha$ -Amylase	Merck
Alkaline Phosphatase	Thermo Fisher Scientific
Amyloglukosidase	Merck
Cellulase „Onazuka“ R-10	Duchefa Biochemie
DNaseI	Thermo Fisher Scientific
EcoRI	Thermo Fisher Scientific
Lysozym	Roth
Macerozym R-10	Duchefa Biochemie
NcoI	New England Biolabs
NotI	Thermo Fisher Scientific
Phusion-Polymerase	Thermo Fisher Scientific
Pronase	Merck
Q5-Polymerase	New England Biolabs
RNase A	Roth
SP6-Polymerase	Thermo Fisher Scientific
SpeI	New England Biolabs
taq-Polymerase	Roth
Terminale Transferase	Thermo Fisher Scientific
T4 Ligase	Thermo Fisher Scientific
T7-Polymerase	Thermo Fisher Scientific

### 2.1.6 Kits

In Tabelle 4 sind die in dieser Arbeit verwendeten Kits aufgelistet.

**Tabelle 4: Verwendete Kits**

<b>Kit</b>	<b>Bezugsquelle</b>
GeneJET Plasmid Miniprep Kit	Thermo Scientific (Dreieich, Deutschland)
GeneJET Plasmid Midiprep Kit	Thermo Scientific (Dreieich, Deutschland)
GeneJET PCR Purification Kit	Thermo Scientific (Dreieich, Deutschland)
GeneJET Gel Extraction Kit	Thermo Scientific (Dreieich, Deutschland)
RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Scientific (Dreieich, Deutschland)
Maxima SYBR Green qPCR Kit	Thermo Scientific (Dreieich, Deutschland)

### 2.1.7 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins (Ebersberg, Deutschland) im bestmöglichen Reinheitsgrad bezogen. Eine detaillierte Auflistung aller verwendeten Oligonukleotide befindet sich im Anhang.

### 2.1.8 Software

Für die computergestützten Arbeiten wurden diverse Softwarepakete, Programme und Webserver verwendet, die in Tabelle 5 benannt sind. Die dazugehörigen Webadressen befinden sich im Anhang.

Tabelle 5: Verwendete Software

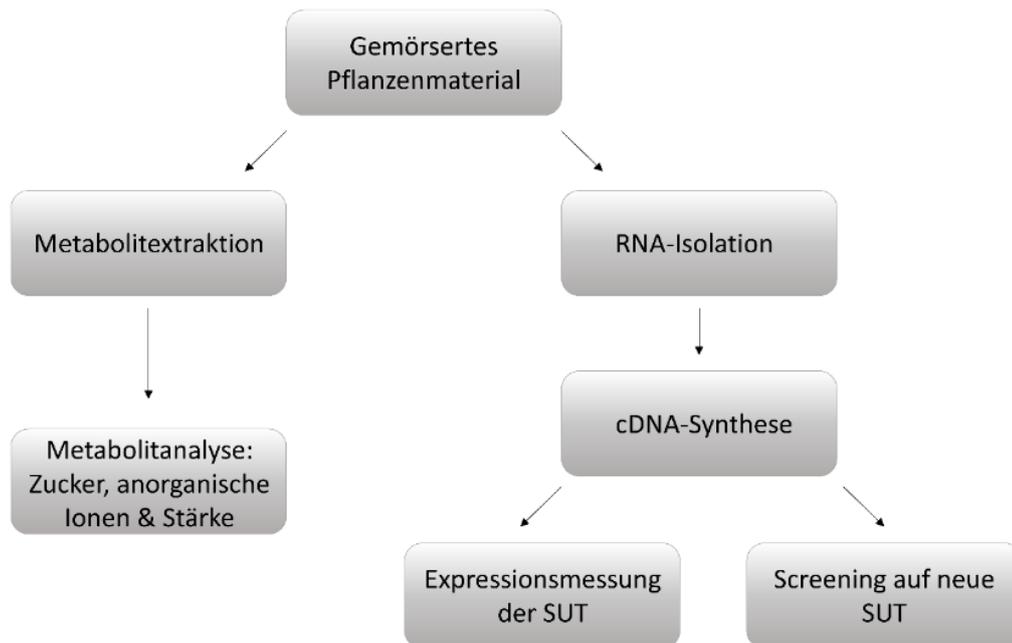
Name	Ver.	Funktion	Referenzen
<b>Bioedit</b>	7.0.5.3	Sequenzalignment und Analyse	
<b>BLAST</b>		<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>	
<b>Chromas Pro</b>	1.5	Auswertung der DNA-Sequenzierung	
<b>Chromeleon</b>	7.2	Auswertung von HPLC-Chromatogrammen	
<b>Expasy</b>		<i>in silico</i> Translation	
<b>Translate</b>			
<b>LAS X</b>		Mikroskopie – Bildaufnahme und Bearbeitung	
<b>MatGAT</b>	2.01	Sequenzhomologie-Alignment	(Campanella <i>et al.</i> , 2003)
<b>MEGA11</b>	11.0.11	Phylogenetische Analyse	(Tamura <i>et al.</i> , 2021)
<b>MxPro</b>	4.10	qPCR-Auswertung	
<b>NCBI</b>		Datenbank	
<b>PerlPrimer</b>	1.1.21	Primerdesign	
<b>Primer 3</b>	4.1.0	Primerdesign	
<b>Protter</b>	1.0	Topographievorhersage	(Omasits <i>et al.</i> , 2014)
<b>TMHMM</b>	2.0	Topographievorhersage	
<b>Zen</b>	16.0.0	Bildaufnahme und -bearbeitung	

## 2.2 Experimentelle Bedingungen

Um den Einfluss von Trockenstress auf die Expression der *SUT* und den Metaboliten Zucker und Stärke, sowie anorganische Ionen zu untersuchen, wurden über einen Zeitraum von 5 Wochen (Pinaceae) bzw. 3 Wochen (Fagaceae) alle 7 Tage Proben von Blättern, Rinde und Holz gesammelt. Die Entnahme erfolgte dabei stets zur selben Tageszeit. Beprobt wurden jeweils 3 Kontroll-Bäume und 3 Trockenstress-Bäume einer Baumart, wobei die Kontroll-Pflanzen regelmäßig gegossen wurden und die Trockenstress-Bäume ab dem Startzeitpunkt T<sub>0</sub>, zu dem die Erde noch viel Feuchtigkeit aufwies, nicht mehr gegossen worden sind. Die Beprobung wurde im ersten Jahr vom 14.06.2018 bis zum 19.07.2018 durchgeführt, bei der ersten Wiederholung des Experiments wurde vom 15.05.2019 bis zum 19.06.2019 Probenmaterial gesammelt, die zweite Wiederholung des Experiments fand vom 09.06.2021 bis zum 14.07.2021 statt. Für jedes Jahr wurden jeweils neue, bisher unbeprobte Bäume desselben Alters verwendet. Das gesammelte Pflanzenmaterial wurde bis zur Aufarbeitung bei -80 °C gelagert.

### 2.3 Aufarbeitung des Pflanzenmaterial

Für weitere Analysen wurde das tiefgefrorene Pflanzenmaterial zu einem feinen Pulver verarbeitet. Dazu wurde es unter der Zugabe von flüssigem Stickstoff in einer Kugelmühle (Retsch, Haan, Deutschland) bis zum gewünschten Feinheitsgrad gemahlen. Das Gewebepulver wurde für weitere Aufarbeitungsschritte (Abbildung 8) bei  $-80\text{ °C}$  zwischengelagert.



**Abbildung 8: Schematische Darstellung über den Ablauf der Verarbeitung des gemörserten Materials.** Das gemörserte Material wurde für die Metabolitanalyse und für Sequenz- und Expressionsanalysen genutzt.

### 2.4 Extraktion der Metabolite aus dem Pflanzengewebe

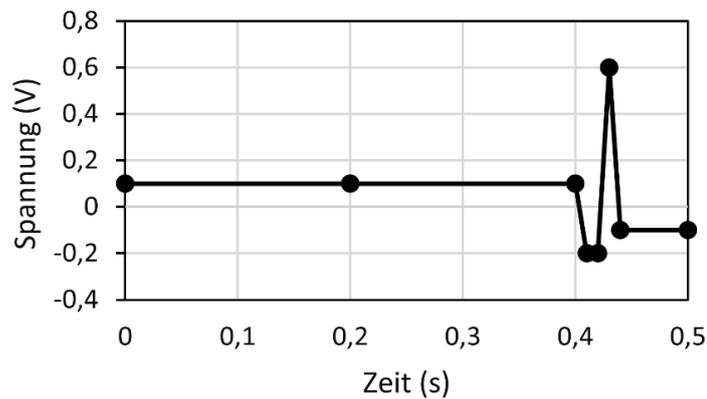
Für eine Extraktion von Zucker, anorganischen Ionen und Stärke wurden etwa 200 mg Gewebepulver in ein Schraubröhrchen eingewogen. Das Pulver wurde mit 5 ml Chloroform/Methanol (3:7 (v/v)) versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurden 5 ml  $\text{H}_2\text{O}$  hinzugegeben, gevortext und für eine saubere Phasentrennung bei 4500 rpm kurz zentrifugiert. Die wässrige Phase, die die Zucker und anorganischen Ionen enthält, wurde abgenommen und in einen 100 ml Rundkolben überführt, um diese in einem Rotationsverdampfer (RV 10, VWR) vollständig zu trocknen. Die Zucker wurden in 1 ml  $\text{H}_2\text{O}$  resuspendiert, steril filtriert ( $0,2\ \mu\text{m}$  Nylonmembran-Filter, Roth) und bei  $-20\text{ °C}$  bis zur weiteren Analyse gelagert.

Aus dem Pellet, welches bei der Zentrifugation entstanden ist, wurde die Stärke isoliert. Das Pellet wurde mit 5 ml 96% Ethanol gewaschen und im Anschluss in 2 ml 0,2 M KOH resuspendiert. Die Lösung wurde für 3 h in einem Schüttelwasserbad bei 80 °C inkubiert. Der pH-Wert wurde mit einer 1 N Essigsäure-Lösung auf 4,5 bis 5,0 gesenkt und kräftig gevortext. Die Proben wurden bis zur endgültigen Analyse bei -20 °C gelagert.

## **2.5 Analyse der Metaboliten**

### **2.5.1 Zuckeranalyse**

Die quantitative Bestimmung des Zuckergehaltes in den Gewebeproben erfolgte durch eine Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (high performance liquid chromatography, HPLC) nach Nadwodnik und Lohaus (2008). Hierbei wurden die zuvor sterilfiltrierten Zuckerlösungen 1:30 mit H<sub>2</sub>O verdünnt, sodass die Konzentration der Zucker im linearen Detektionsbereich des Detektors lag. Getrennt wurden die Zucker durch eine Anionenaustauscher-Säule (Vorsäule: CarboPac PA10 Guard; Hauptsäule: CarboPac PA10, Dionex, Sunnyvale USA). Maßgeblich für die Trennung war die Anzahl der negativen Ladungen an den Zuckern in der mobilen Phase. Die Proben wurden durch den Autosampler in die Eluenten-Zufuhr (50 mM NaOH) der Säule eingespritzt. Die Flussgeschwindigkeit des Systems wird durch die Pumpe auf 0,8 ml/min eingestellt, was zu einem konstanten Druck von etwa 1850 psi führte. Die Detektion der Zucker nach der Elution erfolgte über einen Puls-Amperometrischen Detektor mit einer Goldelektrode (ED Zelle, Dionex, Sunnyvale USA), da Kohlenhydrate aufgrund ihrer molekularen Struktur elektroaktiv sind und oxidiert werden können. Die dafür benötigten Pulseinstellungen sind in Abbildung 9 und Tabelle 6 aufgeführt. Zu jeder Messreihe wurden Standards mitgemessen, die jeweils eine Zuckerkonzentration von 25, 50, 100 und 250 µM pro Zucker enthielten. Mithilfe der Standard-Kurve und der Software Chromeleon (Version 7.2, Dionex, Sunnyvale USA) wurden die chromatographischen Daten analysiert.



**Abbildung 9: Schematische Darstellung der Spannungsänderung eines einzelnen Messpulses am Amperometer.** Für die Reinigung der Elektrodenoberfläche wird ein negatives Potential benötigt, wohingegen die Regeneration der Elektrode ein positives Potential erfordert.

**Tabelle 6: Einstellungen für die Pulsmessung am Amperometer**

Zeit (s)	Spannung (V)	Modus
0	0,1	
0,2	0,1	Messungsstart
0,4	0,1	Messungsende
0,41	-0,2	Reinigung
0,42	-0,2	Reinigung
0,43	0,6	Regeneration
0,44	-0,1	
0,5	-0,1	

### 2.5.2 Analyse der Ionen

Die Analyse von anorganischen Anionen und Kationen wurde in Anlehnung an ein Protokoll nach Lohaus *et al.* (2001) durchgeführt. Als Proben wurden die wässrigen Überstände der Metabolitextraktion verwendet, mit denen auch die Zuckeranalysen durchgeführt wurden. Dabei wurden anorganische Anionen durch eine Anionenaustauschersäule (IonPac™ AS11 4 x 250 mm, Dionex, Sunnyvale USA) mit einem NaOH-Gradienten getrennt (4–77 mM für 30 min). Zur Trennung von anorganischen Kationen wurde eine Kationenaustauschersäule (CS 12A, 4 x 250mm, Dionex, Sunnyvale USA) verwendet und die Proben isokratisch eluiert (20 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) um sie aufzutrennen. Durch die Verwendung eines Suppressors (ASRS Ultra II 4mm, Dionex, Sunnyvale USA) wurde die Spitzenintensität erhöht und das Rauschen der Basislinie verringert, indem die Grundleitfähigkeit des Eluenten vermindert wurde, was wiederum dazu führt, dass die Empfindlichkeit für die Messungen erhöht wurde. Mit

einem elektronischen Leitfähigkeitsdetektor konnten die anorganischen Ionen schließlich quantifiziert werden. Um eine Kalibrierung zu erstellen, wurden zu jeder Messreihe Standards der zu bestimmenden Ionen mitgemessen, die jeweils eine Ionenkonzentration von 100, 250, 500, 750 und 1000  $\mu\text{M}$  pro Komponente enthielten. Die Anionen, die in der Standardreihe verwendet wurden, waren  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{PO}_4^{2-}$  und  $\text{SO}_4^{2-}$ . Bei den Kationen gehörten zu den Standards die Ionen  $\text{Na}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ . Mithilfe der Standard-Kurve und den Programmen PeakNet (Version 5.1, Dionex, Sunnyvale USA) und Chromoleon (Version 7.2, Dionex, Sunnyvale USA) wurden die chromatographischen Daten ausgewertet.

### 2.5.3 Bestimmung des Stärkegehalts

Die Bestimmung des Stärkegehalts erfolgte über einen modifizierten photometrischen Nachweis nach enzymatischer Spaltung der Stärke durch die Amyloglukosidase (Stitt und Heldt, 1981). Hierfür wurden 100  $\mu\text{l}$  der Stärkeextraktion mit 400  $\mu\text{l}$  Spaltungslösung (Tabelle 7) versetzt und für 4 h bei  $55^\circ\text{C}$  im Schüttelwasserbad inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Proben zentrifugiert (2 min bei 13.000 rpm) und der Überstand wurde zur Bestimmung des Glukosegehalts weiterverwendet. Für den photometrischen Nachweis fand eine zweistufige Reaktion statt, bei der im ersten Schritt Glukose mithilfe von ATP und dem Enzym Hexokinase zu Glukose-6-Phosphat umgesetzt wurde. Beim zweiten Schritt wurde das Produkt der ersten Reaktion von der Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase mithilfe vom Cofaktor  $\text{NADP}^+$  zu 6-Phosphogluconolacton oxidiert, wobei das entstandene  $\text{NADPH}/\text{H}^+$  photometrisch gemessen werden konnte. Es wurden 50  $\mu\text{l}$  pro Probe aus der Spaltungsreaktion mit je 690  $\mu\text{l}$  Glukoseverdau-Puffer (Tabelle 7) versetzt, mit einem Plastikspatel verrührt und die Extinktion bei 334 nm gemessen. Nach der Zugabe von 0,1 U Hexokinase und 0,1 U Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase wurde erneut umgerührt und die Proben wurden für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde die Extinktion erneut bei 334 nm aufgezeichnet und aus der Differenz der Extinktionsmessungen vor und nach der Zugabe der Enzyme kann mittels des Lambert-Beer-Gesetzes der Stärkegehalt berechnet werden.

Tabelle 7: Zusammensetzung der Puffer und Lösungen für die Stärkebestimmung

<b>Puffer/Lösung</b>	<b>Substanz</b>	<b>Konzentration/Menge</b>
<b>Spaltungslösung</b>	Natriumacetat	50 mM
	Amyloglukosidase	1,4 U
	$\alpha$ -Amylase	2 U
	pH 4,8	
<b>Glukoseverdau-Puffer</b>	Tris	100 mM
	MgCl <sub>2</sub>	3 mM
	ATP	1,5 mM
	NADP <sup>+</sup>	0,5 mM
	pH 8,0	

## 2.6 Mikrobiologische Methoden

### 2.6.1 Steriles Arbeiten

Alle Arbeiten, die sterile Bedingungen erforderten, wurden unter einer Sterilwerkbank durchgeführt. Die dazu benötigten Gegenstände wurden, soweit möglich, als bereits sterilisiertes Einwegmaterial bestellt oder durch 20-minütiges Autoklavieren bei 120°C sterilisiert. Sonstiges Arbeitsmaterial, welches hitzeempfindlich war, wurde mit 70% Ethanol abgesprüht, bevor es unter die Sterilwerkbank gestellt werden konnte. Lösungen, Medien und Puffer wurden ebenfalls bei 120°C autoklaviert oder durch Spritzenvorsatzfilter der Größe 0,2  $\mu$ m sterilfiltriert.

### 2.6.2 Anzucht von *E.coli*

Die *E. coli* Bakterien wurden auf festem oder im flüssigem LB-Medium (Tabelle 8) mit jeweils passendem Selektionsmedium (Tabelle 10) bei 37 °C über Nacht angezogen. Die Anzucht in Flüssigmedium wurde zusätzlich für eine optimale Nähr- und Sauerstoffversorgung bei 120 rpm geschüttelt. Die über Nacht bewachsenen LB-Platten mit festem Nährmedium konnten für einen längeren Zeitraum im Kühlschrank gelagert werden.

**Tabelle 8: Zusammensetzung Medien zur Anzucht von *E.coli***

<b>Medium</b>	<b>Substanz</b>	<b>Konzentration/Menge</b>
<b>LB</b>	Hefeextrakt	0,5 % (w/v)
	Trypton	1 % (w/v)
	NaCl	1 % (w/v)
	Agar (nur für festes Medium)	1,5 % (w/v)
	pH 7,2	
<b>SOC</b>	Hefeextrakt	0,5 % (w/v)
	Trypton	2 % (w/v)
	NaCl	0,05 % (w/v)
	KCl	0,0186 % (w/v)
	pH 7,0	

### 2.6.3 Herstellung und Transformation chemisch-kompetenter *E. coli* Zellen

Da das Bakterium *E. coli* keine natürliche Kompetenz zur Aufnahme von Plasmiden besitzt, muss diese künstlich erzeugt werden. Die verwendete Methode dafür basiert auf einem Protokoll von Hanahan (1983). Zunächst wurde eine Vorkultur mit *E. coli* Bakterien in SOC-Medium (Tabelle 8) bei 37 °C und 120 rpm über Nacht im Schüttler angezogen. Mit der Vorkultur wurden 50 ml SOC-Medium inokuliert und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 bei 37 °C und 120 rpm geschüttelt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (2200g | 5 min | 4 °C) geerntet und das Zellpellet wurde in 25 ml eiskaltem Transformationspuffer (Tabelle 9) resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen erneut durch Zentrifugation pelletiert und in 5 ml Transformationspuffer und 20% Glycerin (v/v) aufgenommen. Die Bakteriensuspension wurde in 150 µl Aliquots in 1,5 ml Reaktionsgefäße aufgeteilt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

**Tabelle 9: Zusammensetzung des Transformationspuffer für die Herstellung chemisch-kompetenter Zellen**

<b>Puffer</b>	<b>Substanz</b>	<b>Konzentration/Menge</b>
<b>Transformationspuffer</b>	CaCl <sub>2</sub>	100 mM
	RbCl	50 mM
	MnCl <sub>2</sub>	40 mM
	sterilfiltriert	

Für die Transformation der chemisch-kompetenten Zellen wurde eines der aliquotierten Reaktionsgefäße auf Eis aufgetaut, entweder 10-20 ng Plasmid-DNA oder 10 µl eines Ligationsansatzes (Kapitel 2.7) hinzugegeben und für 25 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 45 s der danach rasch unterbrochen wurde, indem die Zellen wieder für 2 min auf Eis gestellt wurden. Für die Etablierung der Antibiotikum-Resistenz wurden die Zellen nach der Zugabe von 900 µl SOC-Medium zunächst bei 37 °C inkubiert (200 rpm | 1 h). Im Anschluss konnten die Zellen auf Selektionsagarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert werden. Zur Selektion wurde ein Antibiotikum entsprechend der vorhandenen Resistenz auf dem Plasmid hinzugefügt (Ampicillin oder Carbenicillin). Optional war die Zugabe von X-Gal, welches als Substrat für die Blau-Weiß-Selektion benötigt wird (Verwendung bei pGEM-T easy Konstrukten).

**Tabelle 10: Verwendete Zusätze für Anzuchtmedien**

<b>Medienzusatz</b>	<b>Endkonzentration</b>
<b>Ampicillin</b>	100 µg/ml
<b>Carbenicillin</b>	100 µg/ml
<b>X-Gal (5-Brom-5-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid)</b>	80 µg/ml

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

Um eine dauerhafte Vervielfältigung eines Plasmids gewährleisten zu können, wurde eine Dauerkultur aus den Bakterien angelegt, die das entsprechende Plasmid tragen. Hierzu wurde eine Bakterienkolonie gepickt, deren Konstrukt zuvor per Sequenzierung verifiziert wurde, um in 3 ml LB-Medium mit Selektionsmedium über Nacht angezogen zu werden. Die angewachsene Flüssigkultur wurde 1:1 mit sterilem Glycerin versetzt und bei -80 °C bis zum erneuten Ausstreichen gelagert.

## 2.7 Molekularbiologische Methoden

### 2.7.1 RNA-Isolierung

Zur Vermeidung von Kontamination durch RNasen wurde jegliches Verbrauchsmaterial doppelt autoklaviert, hitzebeständige Glasbehälter über 8 Stunden bei 200 °C ausgebacken und Oberflächen sowie hitzeempfindliches Material mit RNase AWAY® (Roth) behandelt. Lösungen und Puffer wurden mit DEPC-behandeltem H<sub>2</sub>O (0,1% v/v) und RNase-freien Reagenzien angesetzt.

Zur Isolation von RNA wurde ein abgewandeltes Protokoll nach Chang *et al.* (1993) verwendet, welches sich besonders für phenol- und polysaccharidreiche Gewebe eignet. Dazu wurden 100 – 150 mg des zuvor gemörserten und in flüssigem Stickstoff gelagertem Gewebe eingewogen und mit 800 µl 65 °C warmem CTAB-Puffer versetzt und gut gevortext. Die Proben wurden für 15 min bei 65 °C in einem Thermoschüttler (Biometra) mit 1000 rpm geschüttelt und während der Inkubationszeit gelegentlich gevortext. Nach der Zugabe von 800 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1 (v/v)) wurden die Proben erneut gevortext und für 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert, die daraus resultierende wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Dieser Schritt wurde so oft wiederholt, bis sich keine Interphase mehr gebildet hat. Die wässrige Phase der letzten Extraktion wurde mit einem Viertel Volumenanteil 10 M Lithiumchlorid versetzt, etwa 5-mal invertiert und über Nacht auf Eis bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Proben für 20 min bei 4 °C und 13000 rpm zentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde durch die Zugabe von vorgewärmtem SSTE-Puffer und schüttelnder Inkubation bei 42 °C und 850 rpm gelöst. Die Proben wurden wieder mit gleichem Volumenanteil Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert, bis sich keine Interphase mehr gebildet hat. Die wässrige Phase der letzten Extraktion wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit einem doppelten Volumenanteil -20 °C kaltem Ethanol versehen, invertiert und zum Fällern der RNA für eine Stunde bei -80 °C inkubiert. Danach wurden die Proben für 20 min bei 4 °C und 13000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen und erneut bei 4 °C und 13000 rpm für 10 min zentrifugiert. Nach vollständiger Entfernung des Ethanols wurde das Pellet für 10 min bei 42 °C getrocknet und nach Zugabe von 39 µl DEPC-behandeltem Wasser 10 min bei 42 °C und 850 rpm gelöst. Der Degradierungsgrad der RNA wurde auf einem Agarose-Gel kontrolliert und die gelöste RNA wurde für weitere Arbeiten bei -80 °C gelagert.

Tabelle 11: Zusammensetzung der Puffer für die RNA-Isolation

Puffer	Substanz	Konzentration/Menge
CTAB-Puffer	CTAB	2 % (w/v)
	Tris	100 mM
	EDTA	25 mM
	NaCl	2 M
	PVP	2 % (v/v)
	$\beta$ -Mercaptoethanol (frisch dazu!)	2 % (v/v)
	pH 8,0	
SSTE-Puffer	SDS	0,5 % (w/v)
	Tris	10 mM
	EDTA	1 mM
	NaCl	1 M
	pH 8,0	

### 2.7.2 cDNA-Synthese

Die Isolation von RNA geht stets mit der Isolation von einem geringen Anteil an genomischer DNA (gDNA) einher. Da dies aber das Ergebnis von quantitativen PCR-Analysen beeinträchtigen kann, wurde die gDNA vor der cDNA-Synthese mithilfe von DNase I hydrolysiert. Dazu wurden 2  $\mu$ g RNA mit 2  $\mu$ l DNase I (1 U/ $\mu$ l) und 2  $\mu$ l 10x-Reaktionspuffer in einem Reaktionsansatz von 20  $\mu$ l gemischt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Um die DNase I im Anschluss zu deaktivieren wurde 2  $\mu$ l EDTA (50 mM) hinzugegeben und die Proben für 10 min bei 65 °C erhitzt.

Für die cDNA-Synthese wurde das RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher) verwendet. Hierzu wurden 1  $\mu$ g DNA-freie RNA mit 1  $\mu$ l Oligo(dT)18-Primer in einem 12  $\mu$ l Ansatz vereint und für 5 min bei 65 °C inkubiert, um mögliche Sekundärstrukturen aufzulösen. Anschließend wurden 4  $\mu$ l 5x-Puffer, 1  $\mu$ l RiboLock RNase-Inhibitor (20 U/ $\mu$ l), 2  $\mu$ l dNTP Mix (10 mM) und 1  $\mu$ l RevertAid Reverse Transkriptase (200 U/ $\mu$ l) hinzugegeben und für 1 h bei 42 °C inkubiert und danach für 5 min bei 70 °C inaktiviert. Die synthetisierte cDNA wurde 1:10 verdünnt und für weitere Versuche bei -20 °C gelagert.

### 2.7.3 Primerdesign

Zur Identifikation von SUT in Pflanzenarten, bei denen das Transkriptom noch nicht als entschlüsselt gilt, wurden degenerierte Primer verwendet (Knop *et al.*, 2001; Döbelstein *et al.*, 2018). Abgeleitet wurden die Primer über Alignments der DNA- bzw. Aminosäuresequenzen von bekannten SUT und ihren Homologen in verschiedenen

Arten. Degenerierte Primer enthalten *wobble*-Basen und universelle Basen wie beispielsweise Inosin, die eine vielfältige Bindungsmöglichkeit erlauben. Spezifische Primer wurden entweder aus Datenbanksequenzen oder von sequenzierter DNA mithilfe des Programms Primer3 (Ver. 4.1.0) abgeleitet. Eine Liste der verwendeten Primer befindet sich im Anhang.

#### 2.7.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine Standardmethode zur Vervielfältigung von spezifischen DNA-Fragmenten. Die Reaktionen wurden in einem Thermocycler mit beheizbarem Deckel durchgeführt (Mastercycler, Mastercycler gradient, Mastercycler nexus gradient; Eppendorf). Das PCR-Programm wurde für jede Benutzung entsprechend den verwendeten Primern und der Zielsequenz in seinen Parametern angepasst. Die Zusammensetzung und das Standard-PCR Programm kann den Tabellen 12 und 13 entnommen werden.

**Tabelle 12: Zusammensetzung eines Standard-PCR-Ansatzes**

<b>Komponente</b>	<b>Volumen (<math>\mu</math>l)</b>
10x Puffer	2,5
dNTPs (je 10 mM)	0,5
<i>Forward</i> Primer (10 $\mu$ M)	0,5
<i>Reverse</i> Primer (10 $\mu$ M)	0,5
<i>taq</i> -Polymerase	0,3
Template DNA	1 – 5
dH <sub>2</sub> O	ad 25

**Tabelle 13: Standard-PCR Programm**

<b>Schritt</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Dauer</b>
<b>Initialdenaturierung</b>	94 °C	2 min
<b>Denaturierung</b>	94 °C	20 s
<b>Annealing</b>	50 – 68 °C	30 s
<b>Elongation</b>	72 °C	60 s/kb ( <i>taq</i> Polymerase) 30 s/kb (Phusion, <i>Q5</i> Polymerase)
<b>Finale Elongation</b>	72 °C	5 min
<b>Kühlung</b>	4 °C	$\infty$

35 – 40 x  
Wiederholungen

Für PCR-Reaktionen, bei denen es wichtig war, dass die Sequenz fehlerfrei amplifiziert wird, kam eine *high-fidelity* Polymerase zum Einsatz (*Phusion<sup>TM</sup>*, Thermo Fisher oder *Q5*, NEB).

### 2.7.5 Rapid Amplification of cDNA-Ends (RACE)

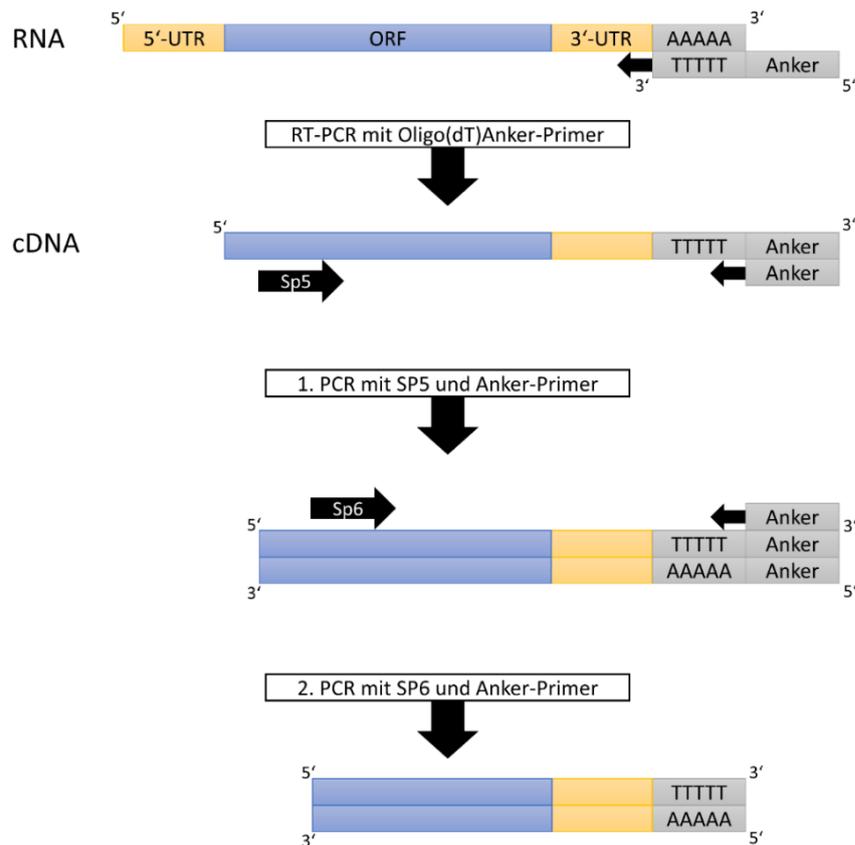
Als RACE wird eine Methode bezeichnet, mit der es möglich ist, die Vollängensequenz eines Gens zu erhalten von dem bisher nur eine Teilsequenz bekannt ist. In dieser Arbeit wurden zunächst mithilfe von degenerierten Primern Sequenz-Teilstücke isoliert, die als Matrize für die RACE-PCR genutzt werden konnten. Die Durchführung lehnt sich an das 5'/3' RACE-Kit von Roche an, aus dem die Sequenz für den anzuhängenden Anker-Primer abgeleitet wurden.

#### 2.7.5.1 3'-RACE

Der Startpunkt für die RACE am 3'-Ende der Zielsequenz ist der sich dort befindliche Poly-A-Schwanz, der bei eukaryotischer mRNA stets vorhanden ist, um sie vor vorzeitigem Abbau zu schützen. Für die cDNA-Synthese wurde ein Oligo(dT)-Primer mit Ankerregion verwendet. Im Anschluss findet eine PCR mit einem ankerspezifischen sowie einem genspezifischen Primer statt (Abbildung 10). Da die genaue Länge des Transkripts zu Beginn der RACE noch nicht bekannt ist, wird ein PCR-Programm verwendet, welches in zwei Phasen eingeteilt wurde. Die erste Phase entsprach dabei einer üblichen PCR-Reaktion, wohingegen in der zweiten Phase die Elongationszeit nach jedem Zyklus um jeweils 20 Sekunden erhöht wurde (Tabelle 14).

Tabelle 14: PCR-Programm für eine RACE-PCR

	Schritt	Temperatur	Dauer	
	<b>Initialdenaturierung</b>	94 °C	2 min	
<b>Phase 1</b>	<b>Denaturierung</b>	94 °C	15 s	10 x Wiederholungen
	<b>Annealing</b>	64 °C	30 s	
	<b>Elongation</b>	72 °C	40 s	
<b>Phase 2</b>	<b>Denaturierung</b>	94 °C	15 s	10 x Wiederholungen
	<b>Annealing</b>	64 °C	30 s	
	<b>Elongation</b>	72 °C	40 s + 20 s pro Zyklus	
	<b>Finale Elongation</b>	72 °C	7 min	
	<b>Kühlung</b>	4 °C	∞	



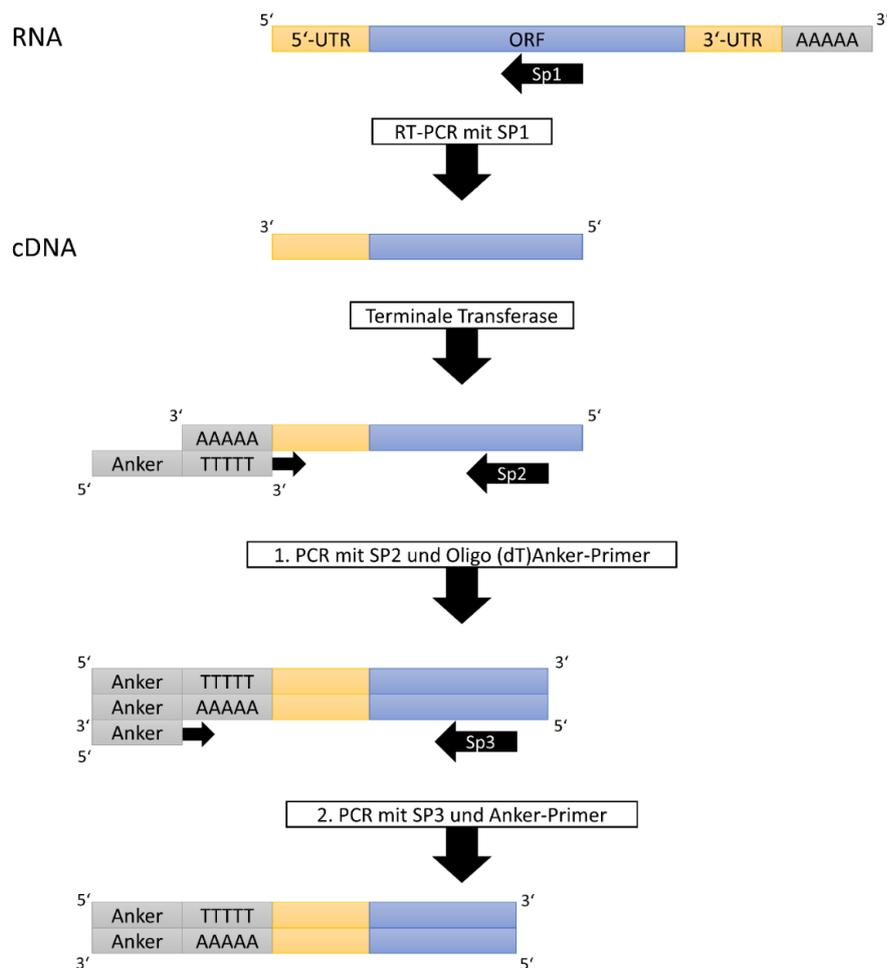
**Abbildung 10: Schematische Darstellung des Ablaufs der 3'-RACE.** Bei der 3'-RACE wird die RNA mithilfe vom Anker-T-Primer in cDNA umgeschrieben. Mithilfe der spezifischen Primern SP5 und SP6 und dem Anker-Primer wird die DNA in zwei PCR-Reaktionen amplifiziert.

Die erste PCR wurde mit dem genspezifischen Primer SP5 durchgeführt. Im zweiten Schritt wurde eine *nested*-PCR durchgeführt, die als Template das zuvor amplifizierte PCR-Produkt nutzt, wobei der hier verwendete genspezifische Primer SP6 etwas weiter innen liegt (Abbildung 10). Das Produkt der zweiten PCR wurde auf ein Agarosegel aufgetragen und mit dem GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Scientific) nach Herstellerangaben ausgeschnitten, aufgereinigt, in ein Plasmid kloniert und zum Sequenzieren geschickt.

### 2.7.5.2 5'-RACE

Da am 5'-Ende der mRNA keine Struktur vorhanden ist, die äquivalent zum Poly-A-Schwanz ist, sind weitere Schritte für die 5'-RACE erforderlich. Die cDNA-Synthese wurde mit einem sequenzspezifischen Primer (SP1) durchgeführt. Im Anschluss wurde durch Polyadenylierung durch die terminale Transferase (TdT) ein künstlicher Poly-A-Schwanz an das 5'-Ende der cDNA synthetisiert. Hierfür wurde die cDNA zunächst mit dem GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Scientific) nach Herstellerangaben aufgereinigt, da die terminale Transferase jedes Nukleotid hinzufügen

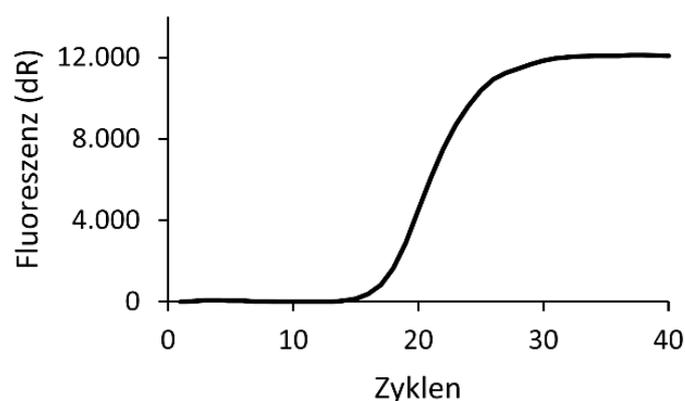
kann und durch die vorhergehende cDNA-Synthese möglicherweise noch verbliebene Nukleotide im Reaktionsansatz zu finden waren. Zur aufgereinigten cDNA wurden 2,5 µl 10x TdT-Reaktionspuffer und 2,5 µl dATP (2 mM) gegeben und für 3 min bei 94 °C inkubiert. Nachdem die Reaktion kurz auf Eis abgekühlt wurde, konnte 2 µl terminale Transferase (40 U/µl) hinzugefügt werden, um für 45 min bei 37 °C inkubiert zu werden. Die Reaktion wurde durch Erhitzen auf 70 °C für 10 min gestoppt. Da der Reaktionspuffer der terminalen Transferase kobalthaltig ist und dadurch die Effizienz der folgenden PCR-Reaktionen beeinträchtigt werden könnten, wurde eine weitere DNA-Aufreinigung durchgeführt. Ähnlich wie bei der 3'-RACE wurde zunächst eine PCR mit einem sequenzspezifischen Primer (SP2) und dem Oligo(dT)Anker-Primer durchgeführt, die dann als Template für eine *nested*-PCR mit einem etwas weiter innen liegenden Primer (SP3) und dem Anker-Primer verwendet wurde (Abbildung 11). Die Aufreinigung und Sequenzierung erfolgte analog zur 3'-RACE.



**Abbildung 11: Schematische Darstellung des Ablaufs der 5'-RACE.** Bei der 5'-RACE wird für die cDNA-Synthese der spezifische Primer SP1 verwendet. Mithilfe der spezifischen Primer SP2 und SP3 sowie den Anker-Primern wird das gesuchte DNA-Fragment in mehreren Schritten amplifiziert.

### 2.7.6 Quantitative Echtzeit-PCR (qPCR)

Durch die quantitative Echtzeit-PCR ist es möglich die Expressionsstärke eines Gens von Interesse (*gene of interest*, GOI) zu bestimmen (Pfaffl *et al.*, 2004). Dafür wird zum PCR-Ansatz der Farbstoff SYBR Green hinzugefügt (Tabelle 15). SYBR Green interkaliert in doppelsträngige DNA und bildet so einen DNA-Farbstoff-Komplex, welcher angeregt mit Fluoreszenzlicht ein starkes Signal emittiert, das nach der Elongationszeit gemessen werden kann (Wittwer *et al.*, 1997). Wird die aufgenommene Fluoreszenz gegen die Zyklenzahl in einem Koordinatensystem aufgetragen ergibt sich ein Graph mit einem sigmoidalen Verlauf (Abbildung 12). An dem Graphen kann man den sogenannten  $C_t$ -Wert (*cycle threshold*, Schwellenwert-Zyklus) ablesen, der sich am Anfang der exponentiellen Phase befindet, denn dort überschreitet das Fluoreszenzsignal zum ersten Mal signifikant das Hintergrundsignal und es wird angenommen, dass die PCR-Reaktion an diesem Punkt mit 100 % Effizienz stattfindet. Da die Ausgangskonzentration der extrahierten mRNA nicht bestimmt werden kann und die Effizienz der Reversen Transkriptase während der cDNA-Synthese schwanken kann, muss das GOI mit einem konstitutiv exprimiertem *housekeeping gene* (HKG) normalisiert werden. Zur Bestimmung der relativen Expression des untersuchten Gens wird der  $C_t$ -Wert des GOI in Relation zum  $C_t$ -Wert des HKG gesetzt, unter der Voraussetzung, dass das HKG nicht vom Experiment in seiner Regulation beeinflusst wird (Pfaffl *et al.*, 2004; Olbrich *et al.*, 2008).



**Abbildung 12: Verlauf einer qPCR-Reaktion.** Zu Beginn ist kaum Fluoreszenzsignal messbar, etwa bei Zyklus 19 überschreitet die Reaktion den Schwellenwert und die PCR ist in der exponentiellen Phase bis schließlich ab Zyklus 30 das Plateau erreicht ist und kein weiteres Produkt mehr gebildet werden kann.

Tabelle 15: Zusammensetzung eines qPCR-Ansatzes

<b>Komponente</b>	<b>Volumen (<math>\mu</math>l)</b>
2x Maxima SYBR Green Master Mix	7,5
ROX (1:10)	0,06
<i>Forward</i> Primer (10 $\mu$ M)	0,3
<i>Reverse</i> Primer (10 $\mu$ M)	0,3
Template DNA	6
dH <sub>2</sub> O	ad 15

Unter optimalen Bedingungen wird die Ziel-DNA bei jedem Amplifikationszyklus verdoppelt, was eine Reaktionseffizienz von 100 % widerspiegelt. Jedoch gibt es verschiedene Faktoren, die die Effizienz einer PCR-Reaktion beeinflussen, weshalb die Effizienz für jedes verwendete Primerpaar experimentell ermittelt wurde. Dazu wurde die gesamte cDNA aus den Experimenten gepoolt und anschließend in einer Verdünnungsreihe von 1:2 gemessen. Mit den generierten Daten konnte eine Standardkurve angefertigt werden, wobei die Steigung die Reaktionseffizienz angibt. Die Erstellung und Auswertung der Standardkurve erfolgte durch die Software MxPro (Version 4.10, Agilent). Primerpaare, die eine PCR-Effizienz zwischen 95 % und 105 % ergeben haben, wurden als geeignete Primer für qPCR-Messungen ausgewählt. Zur Optimierung der jeweils eingesetzten Primerkonzentration wurde eine Primermatrix erstellt (Tabelle 16). Hier wurden verschiedene Mischungsverhältnisse von *forward* und *reverse*-Primer getestet und die Paarung, die sowohl den niedrigsten C<sub>t</sub>-Wert als auch die höchste Fluoreszenz aufweisen konnten, wurde für die experimentellen Messungen verwendet.

Tabelle 16: Primermatrix für die Optimierung der Primerkonzentration

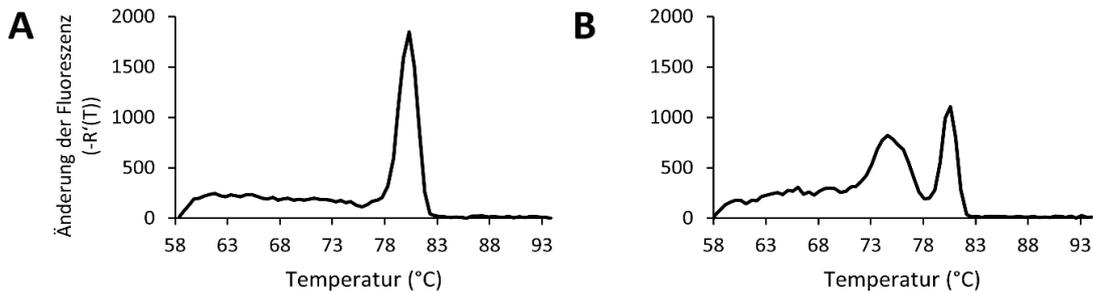
<b>forward</b>	<b>100</b>	<b>200</b>	<b>300</b>
<b>(nM)</b>			
<b>reverse (nM)</b>			
<b>100</b>	100/100	200/100	300/100
<b>200</b>	100/200	200/200	300/200
<b>300</b>	100/300	200/300	300/300

Die Messungen der Experimente wurden jeweils mit zwei technischen Replikaten pro Probe in PCR-Reaktionsgefäßen durchgeführt, deren Deckel für Fluoreszenzmessungen geeignet sind. Der Ablauf einer Standard-qPCR-Reaktion ist in Tabelle 17 dargestellt. Bei dem Gerät handelte es sich um das qPCR-System Mx3005p der Firma Agilent.

**Tabelle 17: Standard-qPCR Programm**

<b>Schritt</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Dauer</b>	
<b>Initialdenaturierung und Aktivierung der Polymerase</b>	95 °C	10 min	
<b>Denaturierung</b>	95 °C	15 s	45 x Wiederholungen
<b>Annealing</b>	53 – 65 °C	30 s	
<b>Elongation</b>	72 °C	15 s	
<b>Dissoziationskurve</b>	53 – 95 °C	5 min	

Nach dem letzten Amplifikationszyklus wurde eine Dissoziationskurve gemessen, welche dazu dient, die Spezifität des gebildeten PCR-Produktes nachzuweisen. Da SYBR Green nicht produktspezifisch bindet, sondern in jede doppelsträngige DNA interkaliert, könnten unerwünschte Nebenprodukte mitgemessen werden. Für die Schmelzkurve wurde die Temperatur des Heizblocks um 0,2 °C pro Schritt angehoben, angefangen bei der Anlagerungstemperatur der Primer bis schließlich mit 95 °C die maximale Denaturierungstemperatur erreicht wurde, während das Fluoreszenzsignal bei jedem Schritt gemessen wurde. Beim Erreichen der produktspezifischen Schmelztemperatur ist ein plötzlicher Abfall des Fluoreszenzsignal messbar, da die doppelsträngige DNA denaturiert und der DNA-Fluorophor-Komplex zerfällt. Wird der Fluoreszenzverlust nun als Funktion der Temperatur in einem Koordinatensystem aufgetragen, zeigt sich der Graph mit einem distinkten Peak, sofern die PCR-Reaktion nur ein Produkt hervorgebracht hat (Abbildung 13A). Sind mehrere Peaks zu sehen, so haben sich Nebenprodukte wie etwa Primerdimere gebildet (Abbildung 13B). Da Nebenprodukte eine genaue Auswertung unmöglich machen, kann das Primerpaar, welches für die Schmelzkurve mit mehreren Peaks verantwortlich ist, nicht für qPCR-Messungen verwendet werden.



**Abbildung 13: Beispiele für zwei Dissoziationskurven.** **A** Eine optimale Schmelzkurve zeigt wie hier nur einen Peak bei 80 °C. **B** Eine Schmelzkurve mit ungeeigneten Primern zeigt mehrere Höhepunkte in der Änderung der Fluoreszenz, ein gewünschter Peak bei 80 °C und ein unerwünschtes Nebenprodukt hat eine Schmelztemperatur von ca. 75 °C.

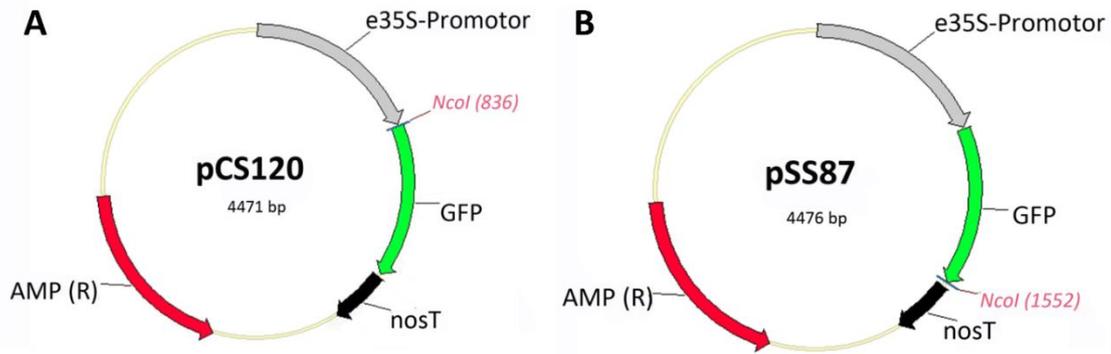
### 2.7.7 Plasmidklonierung

Die Klonierung von aufgereinigten PCR-Produkten wurde für Sequenzierungen oder zur Assemblierung von Expressionsvektoren genutzt. In dieser Arbeit wurden verschiedene Vektoren zur Klonierung genutzt, bei denen die Inserts in unterschiedlichen Verfahren ins Plasmid eingebracht wurden.

#### 2.7.7.1 Klonierung in den pGEM-T easy

Um Inserts in den Vektor pGEM-T easy einzufügen, wurde die TA-Klonierung durchgeführt. Dabei ist der Vektor bereits linearisiert und besitzt an seinen Enden jeweils ein Thymin (T)-Überhang, die PCR-Produkte mussten zum Einfügen ins Plasmid also Adenin (A)-Überhänge besitzen, um ligiert werden zu können (Abbildung 14). Mit der *taq*-Polymerase amplifizierte DNA-Fragmente hatten bereits an ihren 3'-Enden ein A-Überhang und können nach dem Aufreinigen sofort in den Vektor ligiert werden. Da die PCR-Produkte für Sequenzierungsreaktionen mit *high-fidelity* Polymerasen amplifiziert wurden, welche durch ihre *proof reading* Funktion keinen Überhang besitzen, musste vor der Ligation mittels *A-tailing* ein terminales Adenin angehängt werden. Die Ligation von Fragment und Vektor wurde mit der T4 DNA-Ligase (Thermo Fisher) nach Herstellerangaben über Nacht bei 4 °C durchgeführt. Am Folgetag wurden 10 µl der Ligationsansätze in chemisch kompetente *E.coli* Zellen transformiert und auf Selektionsagarplatten mit Ampicillin und X-Gal ausgestrichen. Da durch das Insert im Vektor das *LacZ*-Reporter gen unterbrochen wurde, waren Kolonien, die Plasmide mit Insert tragen, weiß gefärbt. Kolonien mit leerem pGem-T easy hingegen erschienen blau. Zur Analyse wurden mehrere weiße Kolonien ausgewählt, die Plasmide isoliert und eine Testrestriktion durchgeführt, die auf einem Agarosegel analysiert wurde.





**Abbildung 15: Vektorkarten zu den Plasmiden pCS120 und pSS87.** Der Einbau des Fragments erfolgt über eine NcoI-Schnittstelle. Beim Plasmid pCS120 liegt das Fluorophor grün fluoreszierendes Protein (GFP) C-terminal(A), wohingegen das Fragment, welches durch pSS87 exprimiert wird, ein N-terminales GFP trägt (B). Abbildung aus Wolfenstetter (2012).

### 2.7.8 Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde verwendet, um Nukleinsäurefragmente nach ihrer Größe aufzutrennen. Dabei wanderten die negativ-geladenen Nukleinsäuren in einem elektrischen Feld in Richtung der positiv geladenen Anode, wobei kleinere Fragmente schneller und größere Fragmente langsamer durch die Gel-Matrix wandern. Zur Auftrennung von Nukleinsäuren, die größer als 1 kb sind, wurde ein 1%iges Agarose-Gel hergestellt, alle kleineren Fragmente wurden in einem 2%igen Gel aufgetragen. Die zu untersuchenden Proben wurden mit Ladepuffer versetzt, in die Taschen eines TAE-Agarose-Gels (Tabelle 18) gegeben und im Anschluss in einer horizontalen Elektrophoresekammer aufgetrennt.

**Tabelle 18: Zusammensetzung der Stocklösung für den TAE-Puffer**

Puffer	Substanz	Konzentration/Menge
50x TAE-Puffer	Tris	2 M
	Essigsäure	1 M
	EDTA pH 8,0	50 mM

### 2.7.9 Isolierung von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA wurde aus 3 ml Übernachtskulturen von transformierten *E.coli* gewonnen. Um einen höchstmöglichen Reinheitsgrad zu erhalten, wie sie für sensitive Methoden wie die Sanger-Sequenzierung benötigt wird, wurde die Plasmid-DNA mithilfe von kommerziellen Kits aufgereinigt (GeneJet Plasmid Miniprep Kit & GeneJet Plasmid Midiprep Kit, Thermo Fisher). Für Kontrollhydrolysen, Orientierungsbestimmungen durch PCR und Re-Transformationen wurde Plasmid-DNA verwendet, die mit der

STEL-Methode isoliert wurde. Hierbei wurde die bakterielle Zellmembran chemisch durch Triton X-100 lysiert und enzymatisch durch Lysozym abgebaut, was den Zugriff auf die im Cytosol vorliegenden Plasmide ermöglichte.

Zunächst wurden die Zellen pelletiert (13000 rpm | 1 min), in 150 µl STEL-Puffer (Tabelle 19) resuspendiert und für 30 s auf 100 °C erhitzt. Bei der anschließenden Zentrifugation (13000 rpm | 20 min) wurden die lysierten Zellbestandteile pelletiert und die wasserlöslichen Nukleinsäuren verblieben im Überstand, daher wurde das Pellet mit einem Zahnstocher entfernt. Zum Fällern der Nukleinsäuren wurde 180 µl Isopropanol hinzugefügt, die Reaktionsgefäße 5-mal invertiert und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, bevor die Proben erneut zentrifugiert wurden (13000 rpm | 5 min). Das Pellet wurde nach Abnehmen des Überstandes mit 500 µl 70 % Ethanol gewaschen. Schließlich wurde das Ethanol sorgfältig entfernt und die Proben für 10 min bei 45 °C getrocknet. Gelöst wurde das Pellet in 50 µl RNase-H<sub>2</sub>O im Thermoschüttler (850 rpm | 15 min | 45 °C).

**Tabelle 19: Zusammensetzung des STEL-Puffers für die Isolation von Plasmid-DNA**

<b>Puffer/Lösung</b>	<b>Substanz</b>	<b>Konzentration/Menge</b>
<b>STEL-Puffer</b>	Saccharose	8 % (w/v)
	Triton X-100	5 % (v/v)
	Tris/HCl pH 8,0	50 mM
	EDTA	50 mM
	Lysozym (frisch hinzufügen)	0,5 mg/ml

Um den Einbau des richtigen Inserts zu überprüfen wurde eine Kontrollhydrolyse durchgeführt. Hierbei wurden 3 µl des isolierten Plasmids mit einem passenden Restriktionsenzym (EcoRI oder NotI) nach Herstellerangaben hydrolysiert und auf einem 1% Agarose-Gel aufgetragen und analysiert.

## **2.8 mRNA *in-situ*-Hybridisierung**

Die mRNA *in-situ*-Hybridisierung ist eine Methode zum zellspezifischen Visualisieren von Transkripten im Gewebe. Hierbei werden Sonden, die zur Zielsequenz komplementär sind, auf Dünnschnitte aus fixiertem Gewebe gegeben. Dabei sind die Sonden direkt oder indirekt markiert und können so durch verschiedene Methoden lokalisiert werden. Die hier verwendete Methode zur Lokalisation von zellspezifischen Transkripten im Gewebe wurde in Anlehnung an das Protokoll nach Karlgren *et al.* (2009) durchgeführt.

### 2.8.1 Fixieren des Gewebes

Zur Fixierung wurden junge Nadeln, Rinde, Zapfenknospen und vegetative Knospen von *Pinus sylvestris* verwendet. Die Präparation des gesammelten Materials wurde unter der Zugabe von eiskaltem, paraformaldehydhaltigem Fixativ (Tabelle 20) durchgeführt. Um eine bessere Verteilung der Fixierungslösung zu erreichen, wurden Nadeln und Rinde in etwa 5 – 7 mm lange Stücke geschnitten, die Knospen wurden je nach Größe halbiert oder geviertelt. Für eine vollständige Durchdringung wurde schrittweise ein Vakuum angelegt, bis feine Bläschen vom Gewebe aufgestiegen sind. Nach 30 bis 45 Minuten wurde das Vakuum ebenso langsam wieder aufgehoben, die Fixierlösung erneuert und das Gewebe über Nacht bei 4 °C leicht schwenkend inkubiert.

**Tabelle 20: Zusammensetzung der Puffer für die Fixierung**

<b>Puffer/Lösung</b>	<b>Substanz</b>	<b>Konzentration/Menge</b>
<b>10 x PBS</b>	NaCl	1,5 M
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	70 mM
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	30 mM
	pH 7,0	
<b>Fixierungslösung</b>	Paraformaldehyd	4 % (w/v)
	Glutaraldehyd	0,25 % (w/v)
	PBS	1x
	EGTA	70 mM
	DMSO	10 % (v/v)
	Triton X-100	0,05 % (v/v)
	Tween 20	0,05 % (v/v)
	pH 7,2	

Um Dünnschnitte von dem Gewebe herstellen zu können, musste das Pflanzenmaterial zunächst dehydriert und in Wachs eingebettet werden. Die Dehydrationschritte wurden bei 4 °C durchgeführt. Zunächst wurde die Fixierungslösung gegen 0,85 % NaCl ausgetauscht und für 30 min inkubiert. Im Anschluss wurde das Gewebe für jeweils 90 min in einer Ethanol-Reihe mit ansteigender Konzentration (50, 70 und 85 % Ethanol, mit jeweils 0,85 % NaCl; 95 und 100 % Ethanol mit 0,1 % Eosin) dehydriert und über Nacht in 100 % Ethanol mit 0,1 % Eosin gefärbt. Am nächsten Tag wurde das überschüssige Eosin mehrmals mit 100 % Ethanol ausgewaschen und für die Vorbereitung auf die Wachsinfiltration für jeweils eine Stunde in einer Mischung aus 50 % Ethanol und 50 % HistoClear und zweimal in 100 % HistoClear inkubiert. Für eine langsame, aber gleichmäßige Infiltration von Wachs wurde das Gewebe über Nacht in

50 % HistoClear und 50 % Paraplast auf 45 °C erhitzt. Schließlich wurde das Pflanzenmaterial in 100 % Paraplast überführt und für die nächsten drei Tage inkubiert, wobei das Wachs zweimal täglich gewechselt wurde. Nach den drei Tagen Inkubationszeit wurde das vollständig mit Wachs durchzogene Gewebe in Wachsblöcke eingegossen und die fertigen Wachsblöcke bis zur Anfertigung der Dünnschnitte bei 4 °C gelagert.

Alternativ wurde die Dehydratation und Einbettung ab 70 % Ethanol in einem Gewebeeinfiltrationsautomaten (TP1020, Leica) durchgeführt. Durch eine Vakuumfunktion konnte so die Inkubationszeit der Lösungen reduziert werden, da durch das Vakuum eine bessere und schnellere Infiltration erreicht werden konnte. Das Gewebe wurde jeweils 3 h bei RT in folgenden Lösungen inkubiert: 70 % Ethanol, 95% Ethanol + 0,1 % Eosin, 2 x 100 % Ethanol, 50% Ethanol + 50 % HistoClear, 25 % Ethanol + 75 % HistoClear, 3 x HistoClear. Abschließend wurden die Proben jeweils zweimal für 6 h mit 65 °C warmen Paraplast infiltriert. Auch hier wurden die vollständig mit Wachs durchzogenen Gewebestücke in Wachsblöcke gegossen und bis zum Schneiden am Mikrotom bei 4 °C gelagert.

### **2.8.2 Dünnschnitte am Mikrotom**

Zum Einspannen der Proben ins Mikrotom wurden die Gewebestücke als Pyramidenstumpf aus den Wachsblöcken herausgeschnitten und die breite Basis mit Hilfe von Hitze auf eine Einbettkassette geschmolzen, sodass die Nadeln, Rinde oder Knospen im rechten Winkel zur Mikrotomklinge standen und das schmale Ende des Pyramidenstumpfes parallel zur Klinge stand. Die Dünnschnitte wurden mit einer Schnittstärke von 10 – 12 µm und einem Schnittwinkel von 0° angefertigt. Die Schnitte wurden auf Superfrost Plus Objektträger aufgebracht und zum Entfalten des Wachses für kurze Zeit auf eine 40 °C warme Heizplatte gelegt. Nach kurzer Trocknungszeit wurden die fertigen Objektträger über Nacht bei 4 °C gelagert.

### **2.8.3 Vorbereitung der Gewebeschnitte**

Die Dünnschnitte wurden zunächst durch zweimaliges Waschen für 10 Minuten in HistoClear entwacht und anschließend in einer Ethanol-Reihe mit absteigender Konzentration für jeweils 30 s rehydriert. Um die Zugänglichkeit des Gewebes für die RNA-Sonde zu verbessern wurde fixiertes Protein durch den Verdau mit Pronase entfernt (30 min | 37 °C). Der Verdau wurde durch die Inkubation in 0,2 % Glycin gestoppt und

das Gewebe erneut für 10 min in 4 % Paraformaldehyd fixiert. Die Objektträger wurden jeweils zweimal in PBS gewaschen und zur Minimierung von unspezifischer Hintergrundfärbung im späteren Verlauf für 10 min in einer Essigsäure-Anhydrid-Lösung (Tabelle 21) inkubiert. Nach diesem Schritt wurden die Gewebeprobeen erneut zweimal mit PBS gewaschen und in einer Ethanol-Reihe mit aufsteigender Konzentration erneut dehydriert.

**Tabelle 21: Zusammensetzung der Puffer und Lösungen für die Vorbereitung der Gewebeschnitte**

<b>Puffer/Lösung</b>	<b>Substanz</b>	<b>Konzentration/Menge</b>
<b>20 x Pronase-Puffer</b>	Tris	1 M
	EDTA	100 mM
	pH 7,5	
<b>Essigsäure-Anhydrid-Lösung</b>	Triethanolamin	100 mM
	Essigsäure-Anhydrid pH 8,0	0,6 % (v/v)

#### 2.8.4 Vorbereitung auf die Sonden-Synthese

Für die Synthese von transkriptspezifischen Sonden wurde eine Sequenz innerhalb der SUT gewählt, die keine hochkonservierten Bereiche enthält. SUT beinhalten 12 Transmembrandomänen, die unter den verschiedenen Typen eine hohe Sequenzähnlichkeit aufweisen, wobei die 6 und 7 Transmembrandomäne mit einem cytoplasmatischen *loop* verbunden sind. Die Sequenz des *loops* ist variabel zwischen den verschiedenen SUT-Typen und wurde deshalb als Template für die Sonde verwendet. Die PCR-Primer wurden so ausgewählt, dass sie die *loop*-Region flankieren. Die PCR-Produkte wurden in den pGEM-T easy Vektor ligiert und in *E. coli* transformiert. Auf dem Vektor liegen, jeweils flankierend von der *multiple cloning site* (MCS), die Sequenzen für die Promotoren SP6 und T7, welche als Startpunkt der Sondensynthese Verwendung finden. Um die Orientierung des Inserts im Vektor zu bestimmen und um Fehler in der Sequenz auszuschließen wurden die Plasmide für die Sondensynthese zum Sequenzieren geschickt. Es wurden Plasmide ausgewählt, bei denen der T7 Promoter am 5'-Anfang des Inserts lag. Für die Sondensynthese musste das Plasmid im Vorfeld in zwei Ansätzen linearisiert werden, um als Template für eine *sense*- und eine *antisense*-Sonde verwendet zu werden. Für die *sense*-Sonde wurde ein Restriktionsansatz mit NdeI angesetzt, welches in der MCS neben der SP6 Bindestelle schneidet. Für die *antisense*-Sonde wurde das Plasmid mit NcoI linearisiert, da es neben der T7 Promotor Sequenz

eine Schnittstelle dafür besitzt. Für die Restriktionshydrolyse wurden 10 µg Plasmid mit 20 U Enzym versetzt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am Folgetag wurde das Enzym durch einen 30-minütigen Hitzeschock deaktiviert und der Ansatz mit linearisiertem Plasmid über ein PCR-Aufreinigungs-Kit (GeneJet PCR-Aufreinigungs-Kit, Thermo Fisher) gereinigt. Das Ergebnis des Verdau wurde auf einem Agarose-Gel kontrolliert.

### 2.8.5 Sonden-Synthese

Für die Sondensynthese wurde das linearisierte Plasmid als template verwendet. Je nachdem mit welchem Enzym der Vektor hydrolysiert wurde, wurde eine andere RNA-Polymerase eingesetzt. Pro Sonde wurden zwei Transkriptionsansätze vorbereitet, da ein Ansatz nach der Synthese noch hydrolysiert wurde, der andere Ansatz blieb unhydrolysiert. Tabelle 22 zeigt die Zusammensetzung eines einzelnen Ansatzes für die Sondensynthese.

**Tabelle 22: Zusammensetzung eines Ansatzes für die Synthese von RNA-Sonden**

<b>Komponente</b>	<b>Volumen/ Menge</b>
Linearisiertes Plasmid	1 µg
DIG-dNTP-Mix	2 µl
5x Reaktionspuffer	4 µl
T7/SP6 RNA Polymerase	2 µl
RNase Inhibitor	1 µl
DEPC-behandeltes Wasser	Ad 20 µl

Die Synthese wurde für 2 h bei 37 °C durchgeführt. Von dem Synthese-Produkt wurde 1 µl für ein Agarosegel festgehalten, um den Erfolg der Sondentranskription zu verifizieren. Der verbleibende Ansatz wurde mit 74 µl DEPC-behandeltem Wasser, 2 µl tRNA (50mg/ml) und 5 µl DNase versetzt, um die template DNA zu entfernen. Dazu wurde der neue Ansatz bei 37 °C für 45 min verdaut und abschließend wurde die DNase mit der Zugabe von 10 µl EDTA (200 mM) inaktiviert. Nach dem Inaktivieren wurde 1 µl der Reaktion für ein Agarosegel festgehalten, um den Erfolg des DNase-Verdau zu kontrollieren. Um Reaktionspuffer, EDTA oder sonstige Salze von der Sonde zu entfernen, wurde sie über eine Fällungsreaktion gereinigt. Dabei wurde der Ansatz mit Lithiumchlorid und Ethanol gefällt, mit Ethanol gewaschen und in 50 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen um bei -80 °C gelagert zu werden.

### 2.8.5.1 Alkalische Hydrolyse

Da kurze Sonden besser in das Gewebe eindringen konnten, mussten die langen Sondenstücke verkürzt werden. Die alkalische Hydrolyse wurde mit der Zugabe von 50  $\mu$ l Carbonatpuffer pH 10,2 durchgeführt, der aus 200 mM NaHCO<sub>3</sub> und 200 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> für jeden Versuch frisch angesetzt wurde.

Ansatz für den Carbonatpuffer =  $(x \mu\text{l NaHCO}_3 * pH x) + (y \mu\text{l Na}_2\text{CO}_3 * pH y) = (x \mu\text{l NaHCO}_3 + y \mu\text{l Na}_2\text{CO}_3) * pH 10,2$

Die Inkubationszeit hängt von der initialen Länge der eingesetzten Sonde und der final angestrebten Länge ab und konnte mit folgender Formel berechnet werden:

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

(Li = initiale Sondenlänge (kb); Lf = finale Sondenlänge (kb); K = Hydrolyse-Konstante, 0,11 kb/min)

Die Hydrolyse wurde bei 60 °C für die errechnete Dauer durchgeführt, wobei auf eine Sondenlänge von etwa 0,15 kb eingekürzt wurde. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 10  $\mu$ l 10 % Essigsäure und 12  $\mu$ l 3 M Natriumacetat gestoppt und die Sonde wurde im Anschluss durch die Zugabe von Ethanol sowohl gefällt als auch gewaschen, um dann wie die unhydrolysierte Sonde in 50  $\mu$ l RNase-freiem Wasser aufgenommen zu werden. Um den Erfolg der Hydrolyse zu kontrollieren, wurde 1  $\mu$ l der gelösten Sonde auf ein Agarosegel aufgetragen und analysiert. Bis zur Hybridisierung wurden auch die hydrolysierten Sonden bei -80 °C gelagert.

### 2.8.6 Hybridisierung

Für die Hybridisierung von der Sondensequenz an die Zielsequenz wurden hydrolysierte und nicht-hydrolysierte Sonden, als auch ein Gemisch aus beiden verwendet. Dafür wurden Hybridisierungspuffer (Tabelle 23) und Sonde im Verhältnis 50:1 gemischt. Fanden zwei verschiedene Sonden Verwendung, dann wurden sie im Verhältnis 50:0,5:0,5 eingesetzt. Pro Objektträger wurden 100  $\mu$ l Puffer/Sondengemisch aufgetragen und mit einem Streifen Paraplast abgedeckt. Falls Luftblasen entstanden sind, wurden diese vorsichtig herausgestrichen. Die Objektträger wurden waagrecht liegend in einen Objektträgerkasten gelegt, der mit 50 % Formamid durchtränkten Tüchern ausgelegt wurde. Die Kästen wurden luftdicht verschlossen und zum Hybridisieren über Nacht bei 50 °C inkubiert.

**Tabelle 23: Zusammensetzung des Hybridisierungs-Puffers**

<b>Puffer</b>	<b>Substanz</b>	<b>Konzentration/Menge</b>
<b>Hybridisierungs-Puffer</b>	NaCl	3 M
	Tris	100 mM
	NaPO <sub>4</sub>	100 mM
	EDTA	50 mM
	Deionisiertes Formamid	50 % (v/v)
	Dextransulfat	12,5 % (w/v)
	Denhardt's Lösung	2,5 % (v/v)
	tRNA	25 mg/ml
	pH 6,8	

### 2.8.7 Post-Hybridisierung

Die Zusammensetzung der für die Post-Hybridisierung verwendeten Puffer und Lösungen ist in Tabelle 24 aufgeführt. Am Tag nach der Hybridisierung wurden die Parafilmstreifen mithilfe von warmem SSC-Puffer entfernt und die Objektträger wurden erst 30 min und anschließend 90 min bei 50 °C in SSC-Puffer gewaschen. Um freie oder falsch gebundene Sonde zu entfernen, wurde das Gewebe zunächst zweimal in NTE-Puffer gewaschen (5 min | 37 °C), bevor die Objektträger für 30 min bei 37 °C in NTE mit RNase A (20 µg/ml) inkubiert wurden. Nach dem Verdau wurden die Proben dreimal für je 5 min gewaschen und erneut für eine Stunde bei 50 °C in SSC-Puffer gegeben. Im Anschluss wurden die Objektträger für je 5 min erst in PBS und dann in Puffer 1 gewaschen, um folgend darauf 30 min mit Blockierungslösung (Puffer 2) behandelt zu werden. Dieser Schritt reduzierte die unspezifischen Bindungen vom Antikörper an freie Proteine und somit das Hintergrundsignal. Als Vorbereitung auf die Antikörper-Bindung wurden die Proben in Puffer 3 für eine halbe Stunde äquilibriert. Ähnlich wie für die Hybridisierung wurden die Objektträger waagrecht in Objektträgerkästen gelegt, die mit DEPC-Wasser getränkten Tüchern ausgelegt waren, mit 400 µl Puffer 4 (Puffer 3 + Anti-DIG-Antikörper im Verhältnis 1250:1) benetzt und für 2h abgedeckt bei Raumtemperatur inkubiert. Darauffolgend wurden die Präparate jeweils viermal für 20 min mit Puffer 3 gewaschen, danach für je 5 min in Puffer 1 und Puffer 5 äquilibriert. Die Objektträger wurden wieder waagrecht in mit wassergetränkten Tüchern ausgelegten Objektträgerkästen gelegt, mit 400 µl Färbelösung benetzt und für 16 bis 72 h im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Die Färbung wurde zwischendurch unter dem Lichtmikroskop kontrolliert und bei Bedarf wurde frische Färbelösung auf die Proben nachgegeben.

Tabelle 24: Zusammensetzung der Puffer und Lösungen für die Schritte nach der Hybridisierung

<b>Puffer/Lösung</b>	<b>Substanz</b>	<b>Konzentration/Menge</b>
<b>20x SSC</b>	NaCl	3 M
	Natriumcitrat	0,3 M
<b>10x NTE</b>	NaCl	5 M
	Tris	100 mM
	EDTA	10 mM
	pH 7,5	
<b>Puffer 1</b>	Tris	100 mM
	NaCl	150 mM
	pH 7,5	
<b>Puffer 2</b>	Blockreagenz in Puffer 1	0,5 % (w/v)
<b>Puffer 3</b>	BSA	1 % (w/v)
	Triton X-100	0,3 % (v/v)
	in Puffer 1	
<b>Puffer 4</b>	Anti-DIG-Antikörper in Puffer 3	1 : 1250
<b>Puffer 5</b>	Tris	100 mM
	NaCl	100 mM
	MgCl <sub>2</sub>	50 mM
	pH 9,5	
<b>Färbelösung</b>	BCIP	94 µg/ml
	NBT	187 µg/ml
	Levamisol	240 µg/ml
	in Puffer 5	

### 2.8.8 Permanente Einbettung

Nach genügend Inkubationszeit konnten die Objektträger kurz in Puffer 5 gewaschen werden, um im Anschluss mikroskopische Aufnahmen zu erstellen. Für die permanente Einbettung wurden die Proben in einer Ethanol-Reihe mit aufsteigender Konzentration (50, 70, 95 und 100 %, je 2 min) dehydriert und für 10 s in Xylol gewaschen. Nach dem Trocknen wurden die Objektträger mit 2 – 3 Tropfen Entellan eingedeckt und über Nacht zum Trocknen bei Raumtemperatur ausgelegt. Die dauerhaft eingebetteten Proben konnten so jederzeit zur Aufnahme von Bildmaterial verwendet werden.

## 2.9 Isolation und Transformation von Mesophyll Protoplasten aus *Arabidopsis thaliana*

Die Isolation und anschließende Transformation von Mesophyll Protoplasten aus *Arabidopsis thaliana* wurde in Anlehnung an ein Protokoll nach Ochoa-Fernandez *et al.* (2016) durchgeführt. Die Zusammensetzung der Puffer und Lösungen für das Experiment sind in Tabelle 25 und 26 aufgeführt. Die Lösungen wurden nach dem Ansetzen steril filtriert (mit Ausnahme vom PEG-Puffer). Da isolierte Protoplasten sehr fragil gegenüber Scherkräften sind wurden spezielle Pipettenspitzen mit extra weiter Öffnung bei der Verwendung von Mikroliterpipetten eingesetzt. Um mögliche Kontaminationen zu vermeiden, wurde die Isolation und Transformation unter einer Sterilwerkbank durchgeführt.

### 2.9.1 Isolation

Zur Isolation wurden ca. 6 – 8 Wochen alte Pflanzen ausgewählt. Zunächst wurde in zwei sterile Einweg-Petrischalen MMC-Puffer vorgelegt, eine Petrischale mit 4 ml, eine zweite Schale mit 8ml MMC-Puffer. Es wurden so viele Blätter abgeschnitten und in die Schale mit 4 ml MMC gelegt, bis der Boden der Petrischale gut bedeckt war. Die Blätter wurden wenige Male mit einem sterilen Skalpell durchgeschnitten, bis sich keine allzu großen Stücke mehr in der Schale befanden. Während des Schneidens mussten die Blätter stets mit Puffer benetzt sein. Im Anschluss wurden die geschnittenen Blätter in die Petrischale mit dem größeren Volumen MMC überführt und mit 2 ml der Enzymlösung versetzt. Die Schale wurde mit Parafilm versiegelt, mit Aluminiumfolie vor Lichteinstrahlung geschützt und über Nacht bei 23 °C inkubiert.

Am nächsten Tag wurde die Petrischale vorsichtig geschwenkt, um die ersten Protoplasten zu vereinzeln. Zur weiteren Homogenisierung wurde die Protoplastenlösung etwa 4 Minuten lang mit einer Mikroliterpipette behutsam resuspendiert. Die Lösung wurde durch ein Zellsieb mit 70 µm Maschenweite in ein großes Zentrifugenröhrchen gefiltert, auf 50 ml mit MMC aufgefüllt und bei 100 x g für 20 Minuten ohne Bremsfunktion zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Überstand verworfen, die Zellen in 10 ml MSC resuspendiert und in ein kleines Zentrifugenröhrchen mit Rundboden überführt. Um zwei Phasen zu erzeugen, wurde die Protoplastenlösung mit 3 ml 3M vorsichtig überschichtet. Nach einer weiteren Zentrifugation (80 x g | 10 min | keine Bremsfunktion) zeigte sich eine grüne Interphase zwischen MSC und 3M. Die Interphase

wurde abgenommen und mit 7 ml W5 versetzt. Die Anzahl der Zellen wurde durch die Auszählung in einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer bestimmt.

**Tabelle 25: Zusammensetzung der Puffer und Lösungen für die Isolation von Protoplasten**

<b>Puffer/Lösungen</b>	<b>Substanz</b>	<b>Konzentration/Menge</b>
<b>MMC</b>	MES	10 mM
	CaCl <sub>2</sub>	40 mM
	Mannitol	85 g/l
	pH 5,8	
<b>MSC</b>	MES	10 mM
	MgCl <sub>2</sub>	20 mM
	Mannitol	85 g/l
	Saccharose	130 g/l
	pH 5,8	
<b>3M</b>	MgCl <sub>2</sub>	15 mM
	MES	5 mM
	Mannitol	0,456 M
	pH 5,8	
<b>W5</b>	MES	2 mM
	NaCl	154 mM
	CaCl <sub>2</sub>	125 mM
	KCl	5 mM
	Glucose	5 mM
	pH 5,8	
<b>Enzymlösung</b>	Macerozym R-10	50 g/l
	Cellulase „Onozuka“ R-10	50 g/l
	in MMC	

### 2.9.2 Transformation

Die Transformation fand in 6-Well-Schalen statt. Hier wurde 30 µg Plasmid-DNA vorgelegt. In der Zwischenzeit wurden die Zellen durch Zentrifugation (80 x g | 10 min | keine Bremsfunktion) pelletiert und in so viel 3M resuspendiert, dass sie in einer Zelldichte von 5000 Zellen pro µl vorlagen. Jeweils 100 µl der Zellsuspension wurde zu einem Well gegeben und vorsichtig mit der Plasmid-DNA gemischt. Nach 5 min Inkubationszeit wurde 120 µl PEG-Lösung auf das Zell-DNA-Gemisch geträufelt und weitere 9 min inkubiert. Die Transformation wurde durch die Zugabe von 120 µl 3M und 1240 µl PCA gestoppt. Die 6-Well-Schale wurde mit Parafilm versiegelt und mindestens

24 h bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach der Mindestinkubationszeit wurde die Expressionsstärke unter einem Fluoreszenzmikroskop kontrolliert.

**Tabelle 26: Zusammensetzung der Puffer und Lösungen für die Transformation von Protoplasten**

<b>Puffer/Lösungen</b>	<b>Substanz</b>	<b>Konzentration/Menge</b>
<b>PEG</b>	Mannitol	2,5 ml von 0,8 M Stammlösung
	CaCl <sub>2</sub>	1 ml von 1 M Stammlösung
	PEG <sub>4000</sub>	4 g
	Steril filtriertes dH <sub>2</sub> O	3 ml
<b>PCA</b>	Gamborg B5 Salze	3,2 g/l
	MgSO <sub>4</sub>	500 mg/l
	CaCl <sub>2</sub>	500 mg/l
	MES	976 mg/l
	Glutamin	50 mg/l
	Saccharose	20 g/l
	Glucose	80 g/l
	Ca-Pantothenat	2 mg/l
	Biotin	20 µg/l
	Gamborg B5 Vitamin Mix	1 ml/l
	pH 5,8	

## 2.10 Statistik

Zunächst wurde die Normalverteilung aller erhobenen Daten mithilfe des Q-Q-Diagramms und die Homogenität mit dem Brown & Forsythe Test kontrolliert. Konnten beide Parameter erfüllt werden, so wurde ein *t*-Test oder bei einem Vergleich mehrerer Gruppen miteinander eine Einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt. Im Anschluss an die ANOVA wurde abschließend der Tukey's HSD (*honestly significant difference*) Test angewendet. Das Signifikanzniveau liegt für beide Tests bei  $p \leq 0,05$ .

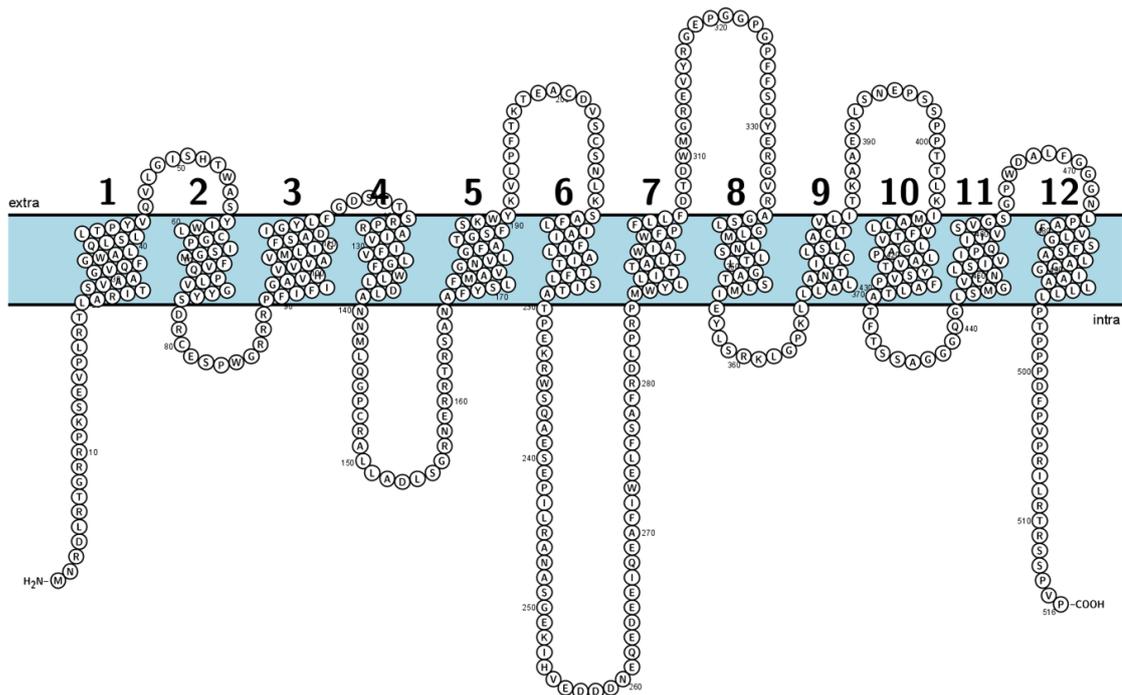
### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Saccharosetransporter-Sequenzen aus *Pinus sylvestris*

Für die Aufklärung des Transportmechanismus in Gymnospermen war ein wichtiges Ziel die Isolation von Saccharosetransporter-cDNA aus der Konifere *Pinus sylvestris*. Im Zuge dieser Arbeit konnten Vollängensequenzen von zwei Saccharosetransportern gefunden werden, die in zwei von den vier nach Peng *et al.* (2014) eingeteilten Typen zugeordnet werden können (siehe Abbildung 18 und Tabelle 27). Die Benennung der identifizierten Transporter erfolgte nach ihren Homologen in *Arabidopsis thaliana*, bei denen die SUT nach der Reihenfolge ihrer Entdeckung nummeriert wurden.

##### 3.1.1 Identifizierung von *PsySUT1*

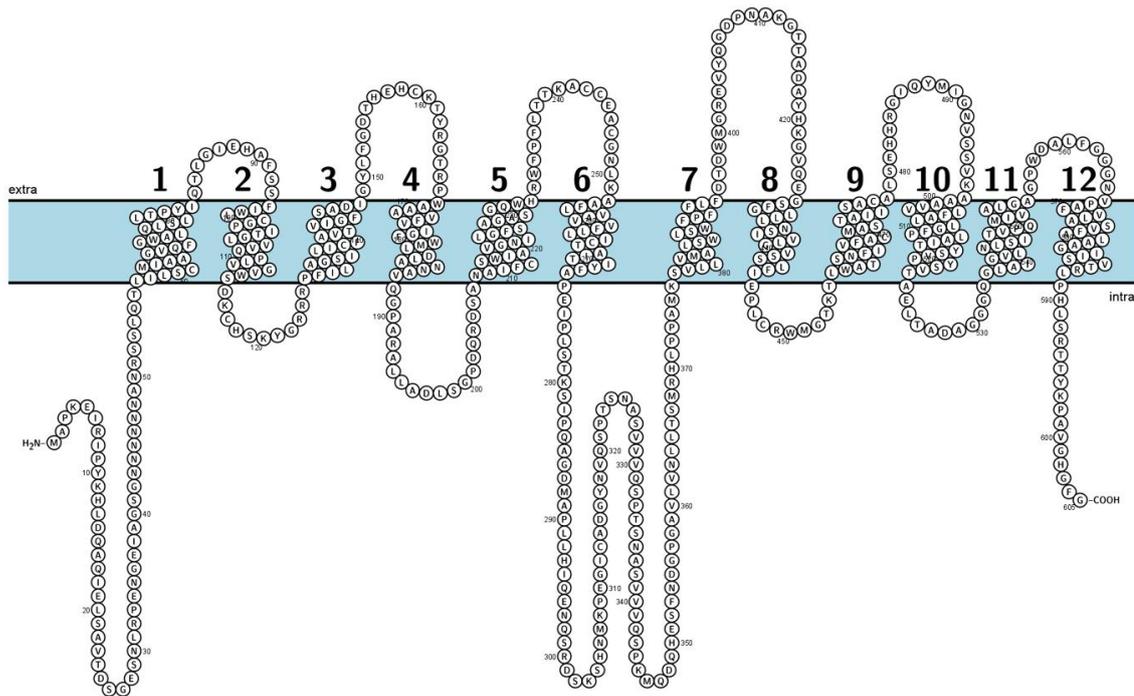
Für *P. sylvestris* stand zu Beginn der Forschungsarbeit noch keine cDNA-Datenbank zur Verfügung, weshalb zunächst degenerierte Primer zur Amplifikation der gesuchten Sequenzen zur Verwendung kamen. Nach zahlreichen PCRs konnte eine cDNA-Sequenz von 350 Nukleotiden isoliert werden, die mithilfe von RACE-PCR vervollständigt wurde. Unter der Verwendung von Vollängenprimern und der Amplifikation mit einer *proof-reading* Polymerase wurde die experimentell gefundene Sequenz durch anschließende Sequenzierung verifiziert. Die cDNA-Sequenz für *PsySUT1*, die 1551 Nukleotide lang ist, befindet sich im Anhang. Die daraus abzuleitende Proteinsequenz ist 516 Aminosäuren lang. Die Topologievorhersage des Proteins in Abbildung 16 zeigt, dass es vermutlich 12 membranständige Domänen gibt, wobei die Domänen 6 und 7 mit einem etwas längeren, cytoplasmatischen *loop* verbunden sind. Sowohl der N- als auch der C-terminale Teil des Proteins befinden sich im Cytoplasma.



**Abbildung 16: Topologievorhersage für das Protein PsySUT1.** Die Berechnung der Sekundärstruktur zeigt für die Aminosäuresequenz von PsySUT1 den typischen Aufbau eines SUT mit 12 membranspannenden Domänen und dem typischen zentralen im Cytoplasma gelegenen *loop*. Die Abbildung wurde mithilfe von dem webbasierten, interaktiven Proteindatenanalyse-Tool Protter erstellt (Omasits *et al.*, 2014).

### 3.1.2 Identifizierung von *PsySUT2*

Neben dem SUT1 wurde ein weiterer SUT gefunden. Durch sehr hohe Sequenzhomologien zwischen bereits publizierten SUT aus Koniferen ist es gelungen die Vollängensequenz von *PsySUT2* durch die Verwendung der Vollängenprimer von *Picea abies*, einem weiteren Vertreter der Familie der Pinaceae, zu identifizieren. Auch hier wurde das PCR-Produkt durch die Amplifizierung mit einer *proof-reading* Polymerase mit anschließender Sequenzierung überprüft. Die cDNA-Sequenz von *PsySUT2* ist 1818 Nukleotide lang und befindet sich im Anhang. Das entsprechend translatierte Protein setzt sich aus 605 Aminosäuren zusammen. Auch die Vorhersage für PsySUT2 zeigt 12 Transmembrandomänen, mit cytoplasmatisch gelegenen N- und C-Terminus als auch einem cytoplasmatischen *loop* zwischen den Domänen 6 und 7 (Abbildung 17). Im Vergleich zu PsySUT1 fällt hier auf, dass sowohl der N-terminale Teil als auch der zentral gelegene *loop* bei PsySUT2 deutlich länger sind.



**Abbildung 17: Topologievorhersage für das Protein PsySUT2.** Die Berechnung der Sekundärstruktur zeigt für die Aminosäuresequenz von PsySUT2 den typischen Aufbau eines SUT mit 12 membranspannenden Domänen und dem typischen zentralen im Cytoplasma gelegenen *loop*, der bei SUT des Typ II deutlich länger ausfällt. Die Abbildung wurde mithilfe von dem webbasierten, interaktiven Proteindatenanalyse-Tool Protter erstellt (Omasits *et al.*, 2014).

### 3.2 Ähnlichkeits- und Identitätsvergleiche der verschiedenen SUT

Sequenzanalysen zwischen den in dieser Arbeit identifizierten SUT und bereits publizierten SUT (Tabelle 27) haben ergeben, dass die Ähnlichkeit von SUT desselben Typs (72 - 95 %) höher ist als die Ähnlichkeiten zwischen den drei verschiedenen Typen (39 – 72 %). Beim Vergleich innerhalb der Typen fällt auf, dass die Ähnlichkeit der beiden hier identifizierten *P. sylvestris* SUT in der eigenen Gruppe der Gymnospermen (84 – 95 %) am höchsten ist. Innerhalb der Familie der Pinaceae liegt die Ähnlichkeit sogar bei über 90 %. Auffällig ist auch, dass die Ähnlichkeit von PsySUT1 zu dem Angiospermen SUT4 von *Q. robur* mit 72,5 % geringfügig höher ist als zu *Q. robur* SUT1 mit 72,1 %. Vergleicht man jedoch die identischen Aminosäuren miteinander, so hat QrSUT1 mit 55,9 % mehr übereinstimmende Aminosäuren im Bezug zu PsySUT1, QrSUT4 und PsySUT1 haben nur 52,7 % Identität gemeinsam. Der einzig bisher identifizierte SUT des Typ III einer Gymnosperme ist SUT4 aus *G. biloba*, der mit PsySUT1 etwa 71,6 % Ähnlichkeit teilt, wohingegen *G. biloba* SUT1 und PsySUT1 sich zu 84,7 % ähneln, weshalb PsySUT1 dem Typ I zugeordnet wurde.

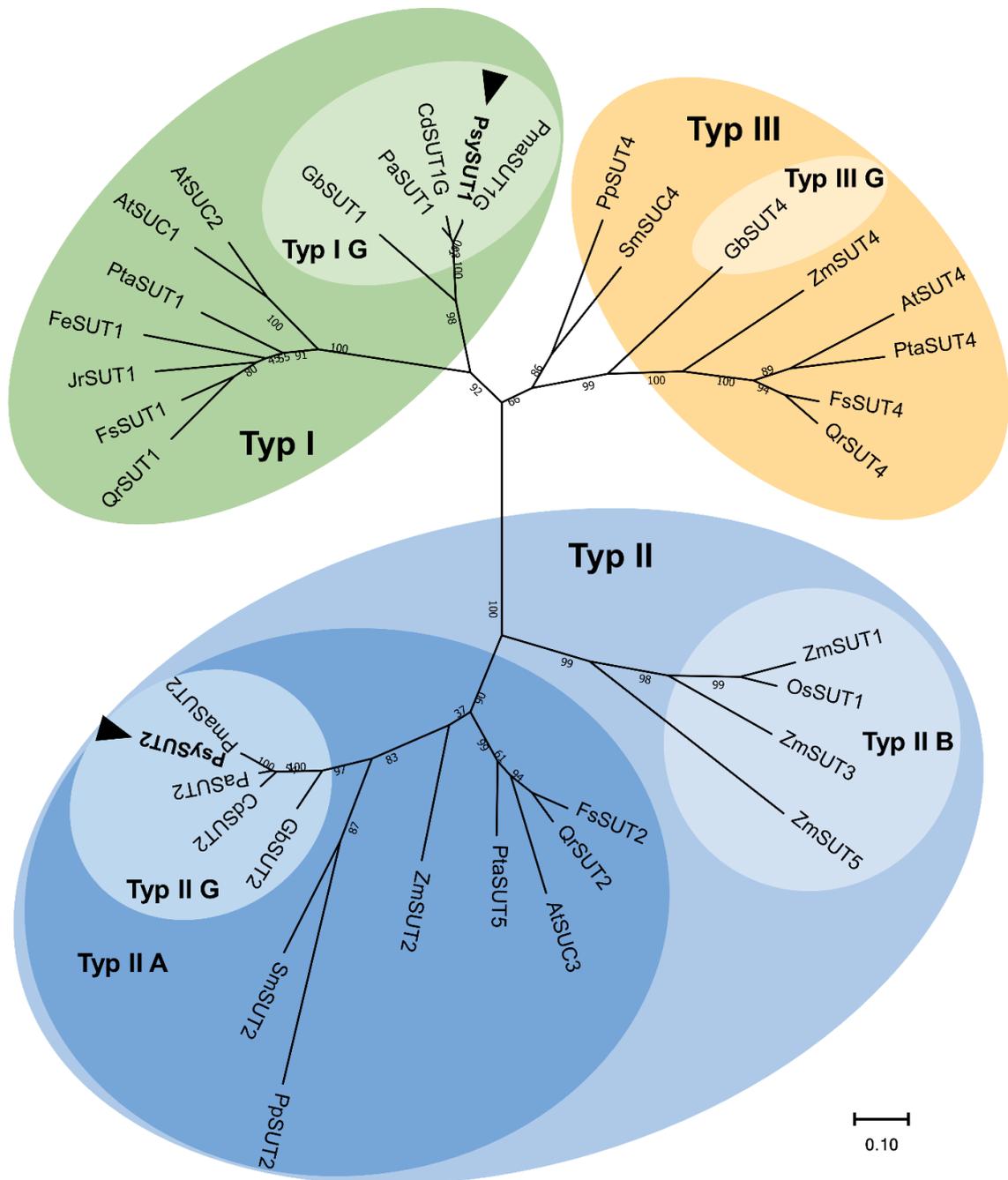
**Tabelle 27: Prozentsatz der Ähnlichkeit und Identität auf Aminosäureebene von ausgewählten Saccharose-Transportern.** Die Einteilung der Transporter nach Typen basiert auf einer Studie nach Peng *et al.* (2014). SUT aus *Pinus sylvestris* sind fett hervorgehoben. Die Zugriffsnummern der anderen SUT befinden sich im Anhang. Der Sequenzvergleich wurde mit MatGAT durchgeführt (Campanella *et al.*, 2003). Gymnospermen: Cd: *Cedrus deodara*; Gb: *Ginkgo biloba*; Pa: *Picea abies*; Psy: *Pinus sylvestris*; Angiospermen: Qr: *Quercus robur*.

		Ähnlichkeit (%)											
		Typ I					Typ II					Typ III	
		Psy SUT 1	Pa SUT 1	Gb SUT 1	Cd SUT1 G	Qr SUT 1	Psy SUT 2	Pa SUT 2	Gb SUT 2	Cd SUT 2	Qr SUT 2	Gb SUT 4	Qr SUT 4
Identität (%)	PsySUT1	<b>95,7</b>	<b>84,7</b>	<b>95</b>	<b>72,1</b>	<b>60,5</b>	<b>63</b>	<b>64,5</b>	<b>61,7</b>	<b>60,8</b>	<b>71,6</b>	<b>72,5</b>	
	PaSUT1	<b>92,8</b>		85,9	96,5	71,5	<b>60,8</b>	63,4	64	61,9	61,8	73,2	71,3
	GbSUT1	<b>72,1</b>	72,5		85,3	70,8	<b>61,2</b>	62,2	63,8	61,9	62,4	71,9	71,4
	CdSUT1G	<b>91,5</b>	94,2	72,3		72,1	<b>60,5</b>	62,7	63,5	61,2	60,8	72,5	70,7
	QrSUT1	<b>55,9</b>	56,3	54,9	56,3		<b>59</b>	59,8	59,9	59,2	58,2	63,9	68
	PsySUT2	<b>42,7</b>	<b>42,9</b>	<b>41,7</b>	<b>42,7</b>	<b>39,7</b>		<b>94,2</b>	<b>87,6</b>	<b>91,7</b>	<b>77,6</b>	<b>63,3</b>	<b>57,7</b>
	PaSUT2	<b>44,3</b>	43,9	42,7	43,9	39,6	<b>89,8</b>		90,8	95,6	78,5	63,7	59,5
	GbSUT2	<b>44,9</b>	44,1	42,1	44,4	40,2	<b>78,7</b>	83,1		90,7	79	64,6	60,6
	CdSUT2	<b>44,1</b>	43,9	42,7	44	39,5	<b>87,5</b>	92,8	82,2		78,5	63,7	60,4
	QrSUT2	<b>41,4</b>	42,6	41,8	41,2	37,5	<b>62,6</b>	64,3	63,9	64,2		61,8	59,3
	GbSUT4	<b>54,3</b>	55,2	52,2	54,9	48,2	<b>44,2</b>	45,4	45,6	44,8	42,5		73,7
	QrSUT4	<b>52,7</b>	51,9	51,6	51,2	49,2	<b>41,2</b>	41,4	42,2	41,7	40,5	57,6	

### 3.3 Phylogenetische Analyse

Über die Alignments, mit denen ebenfalls die Ähnlichkeiten und Identitäten berechnet wurden, konnte ein Stammbaum mit ausgewählten SUT erstellt werden. Die phylogenetische Analyse in Abbildung 18 zeigt, dass sich innerhalb eines Typs Subcluster von verwandten Arten bilden. So bilden die SUT aus Angiospermen und Gymnospermen jeweils eine eigene distinkte Gruppe innerhalb des Typ I SUT, wobei das Subcluster, zu dem auch der in dieser Arbeit identifizierte PsySUT1 gehört, welcher von Han *et al.* (2022) Typ I G genannt wurde, um die große evolutionäre Distanz zwischen Gymnospermen und Angiospermen SUT1 widerzuspiegeln und die distinkte Clusterung hervorzuheben. Innerhalb des Typ II kann ebenfalls eine klare Clusterung von verwandten Arten erkannt werden, wobei Gymnospermen und die dikotyledonen Angiospermen eigene Sub-Gruppen bilden. Die monokotyl-spezifischen SUT des Typ II B bilden ebenfalls ein eigenes Subcluster innerhalb des Typ II. Der in dieser Arbeit gefundene PsySUT2 befindet sich in der distinkten Gruppe der Gymnospermen des Typ II, die aufgrund der Gruppierung als Typ II G bezeichnet werden kann. Innerhalb des Typ III liegen die SUT der Angiospermen nah beieinander, wohingegen GbSUT4 eine große evolutionäre Distanz zu den restlichen Typ III SUT aufweist und im Stammbaum zwischen einem SUT aus einem Moosfarn, SmSUC4, und einem SUT aus einer

monokotylen Angiosperme, ZmSUT4, zu finden ist. Eine Gruppierung ist jedoch nicht zu erkennen, da GbSUT4 der bisher einzige in Gymnospermen identifizierte SUT des Typ III ist.



**Abbildung 18: Phylogenetische Analyse von ausgewählten Saccharose-Transportern.** Das Alignment der Aminosäuresequenzen wurde mit ClustalW erstellt, welches als Add-In in MEGA 11 enthalten ist. Der Stammbaum wurde als *maximum-likelihood*-Modell mit 1000 *bootstrap*-Wiederholungen mithilfe von MEGA 11 berechnet (Tamura *et al.*, 2021). Der Maßstab gibt die evolutionäre Distanz an, die Zahlen an den Knotenpunkten zeigen die Häufigkeit der Abzweigung innerhalb der *bootstrap*-Durchgänge in Prozent an. Die in dieser Arbeit identifizierten Proteine sind fett gedruckt und mit einer Pfeilspitze markiert. Eine Liste mit den Zugriffsnummern aller Sequenzen befindet sich im Anhang. At: *Arabidopsis thaliana*; Cd: *Cedrus deodara*; Fs: *Fagus sylvatica*; Fe: *Fraxinus excelsior*; Gb: *Ginkgo biloba*; Jr: *Juglans regia*; Os: *Oryza sativa*; Pa: *Picea abies*; Pma: *Pinus massoniana*; Pp: *Physcomitrella patens*; Psy: *Pinus sylvestris*; Pta: *Populus tremula x alba*; Qr: *Quercus robur*; Sm: *Selaginella moellendorffii*; Zm: *Zea mays*.

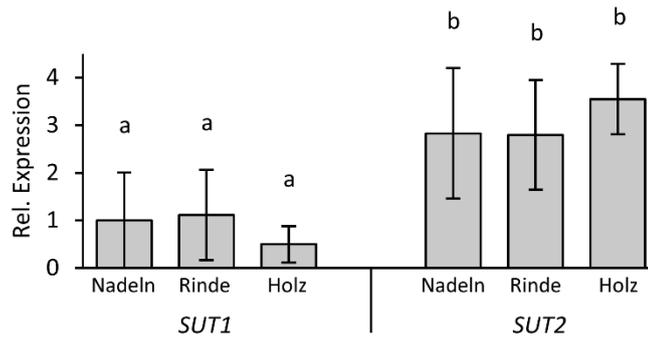
### 3.4 Funktionscharakterisierung von *PsySUT1* und *PsySUT2*

Da anhand der Topologievorhersage und den phylogenetischen Analysen keine Rückschlüsse auf die Transportfähigkeit der putativen Saccharosetransporter gezogen werden konnte, wurde die heterologe Expression in Hefe in Zusammenarbeit mit Dr. Klebl (AG Molekulare Pflanzenphysiologie, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg) durchgeführt. Hierzu wurden die zuvor identifizierten Vollängensequenzen in *sense*- und *antisense*-Richtung in den *shuttle-vektor* pNEV-N kloniert, dabei diente das *sense*-Konstrukt der Positivkontrolle und das *antisense*-Konstrukt wurde als Negativkontrolle betrachtet. Das *GOI* wurde im pNEV-N unter der Kontrolle des starken Promotors der Plasmamembran  $H^+$ -ATPase *PMA1* exprimiert (Serrano *et al.*, 1986). Die Expression fand im Zellwandinvertase-defizientem Hefestamm SEY 2102 statt, welcher ohne funktionale Saccharosetransporter nicht auf einem Wachstumsmedium mit Saccharose als Kohlenstoffquelle wachsen kann. Dabei wurde die Transportfähigkeit durch Wachstum auf saccharosehaltigem Medium geprüft, die Transporteraktivität wurde anhand der Aufnahme von radioaktiver Saccharose bestimmt.

Bei wiederholten Aufnahmetests konnte jedoch für die beiden SUT aus *P. sylvestris* (*PsySUT1* und *PsySUT2*) keine Saccharose-Aufnahme in den transformierten Hefen festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

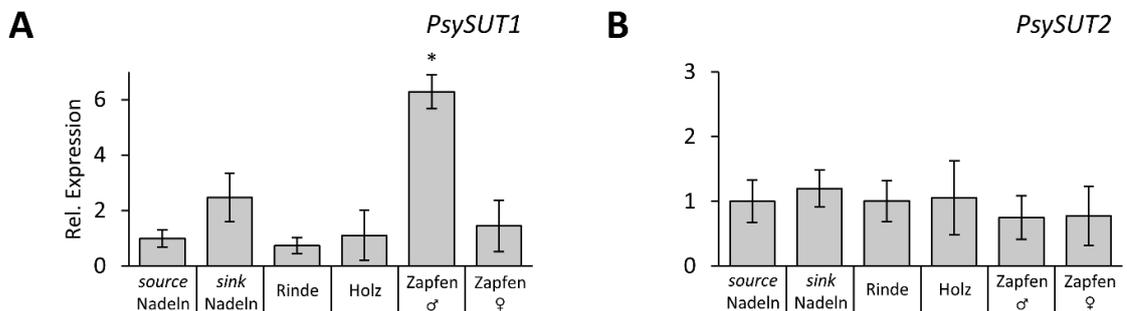
### 3.5 Organ-spezifische Expression von *PsySUT1* und *PsySUT2*

Die organ-spezifische Expression kann ein Hinweis auf die Lokalisation und entsprechend auch auf die mögliche Funktion der gesuchten Proteine geben. Aus diesem Grund wurde die Expression von *PsySUT1* und *PsySUT2* in den Organen Nadeln, Rinde und Holz mittels qPCR untersucht. Um die Messwerte der einzelnen Proben vergleichen zu können, wurde für jede Probe die Expression von einem konstitutiv exprimierten Gen, einem sogenannten *housekeeping gene* (HKG), bestimmt und zur Normalisierung verwendet. Für *P. sylvestris* wurde *Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase* (*GAPDH*) als HKG ausgewählt. *GAPDH* kodiert für ein Enzym, welches in der Glykolyse an dem Aufbau von ATP beteiligt ist.



**Abbildung 19: Expression von *PsySUT1* im Vergleich zu *PsySUT2*.** Gemessen wurde die Expression jeweils in den Geweben Nadeln, Rinde und Holz. Die Werte wurden als relative Expression angegeben, wobei *PsySUT1* in Nadeln als Kalibrator dient. Unterschiedliche Buchstaben stellen signifikante Unterschiede in den Expressionsniveaus dar (Tukey's HSD;  $p < 0,05$ ). Mittelwerte  $\pm$  SD,  $n = 45$

Die Expressionsniveaus innerhalb der Organe Nadeln, Rinde und Holz waren sowohl beim *SUT1* als auch beim *SUT2* relativ ähnlich, wohingegen die Expression von *SUT2* in allen Organen verglichen zur Expression von *SUT1* im Mittel dreimal höher war. Damit ist *PsySUT2* deutlich stärker in den untersuchten Geweben exprimiert als *PsySUT1* (Abbildung 19).



**Abbildung 20: Relative Expression von *SUT* in verschiedenen Organen.** Die Expression wurde bei *PsySUT1* (A) und *PsySUT2* (B) jeweils relativ zum Kalibrator (hier: *source*-Nadeln) gemessen. Mithilfe vom t-Test wurde auf signifikante Unterschiede im Vergleich zum Kalibrator getestet (\* =  $p < 0,05$ ). Mittelwerte  $\pm$  SD,  $n = 3$

Neben den vegetativen, oberirdischen Organen von *P. sylvestris* wurden für die Expressionsstärken innerhalb der SUT weitere Gewebetypen untersucht. So wurden Nadeln je nach Alter in *source*- und *sink*-Nadeln unterteilt und es wurden sowohl männliche als auch weibliche Zapfen gesammelt. Die Expression von *PsySUT1* zeigte sich in Rinde, Holz und weiblichen Zapfen auf Kalibrator-Niveau. Als Kalibrator wurde die Expression in den *source*-Nadeln verwendet. Die Expression in *sink*-Nadeln war zweimal so stark wie in den *source*-Nadeln, jedoch war die stärkere Expression nicht statistisch signifikant höher. Eine 6-fach erhöhte Expression hingegen konnte man in den

männlichen Zapfen erfassen, hier war die Expression signifikant höher im Vergleich zu den *source*-Nadeln (Abbildung 20A). Die Expression von *PsySUT2* in den verschiedenen Organen zeigte eine sehr einheitliche Expressionsstärke ohne signifikante Unterschiede (Abbildung 20B).

### 3.6 Zellspezifische Expression von *PsySUT1* und *PsySUT2*

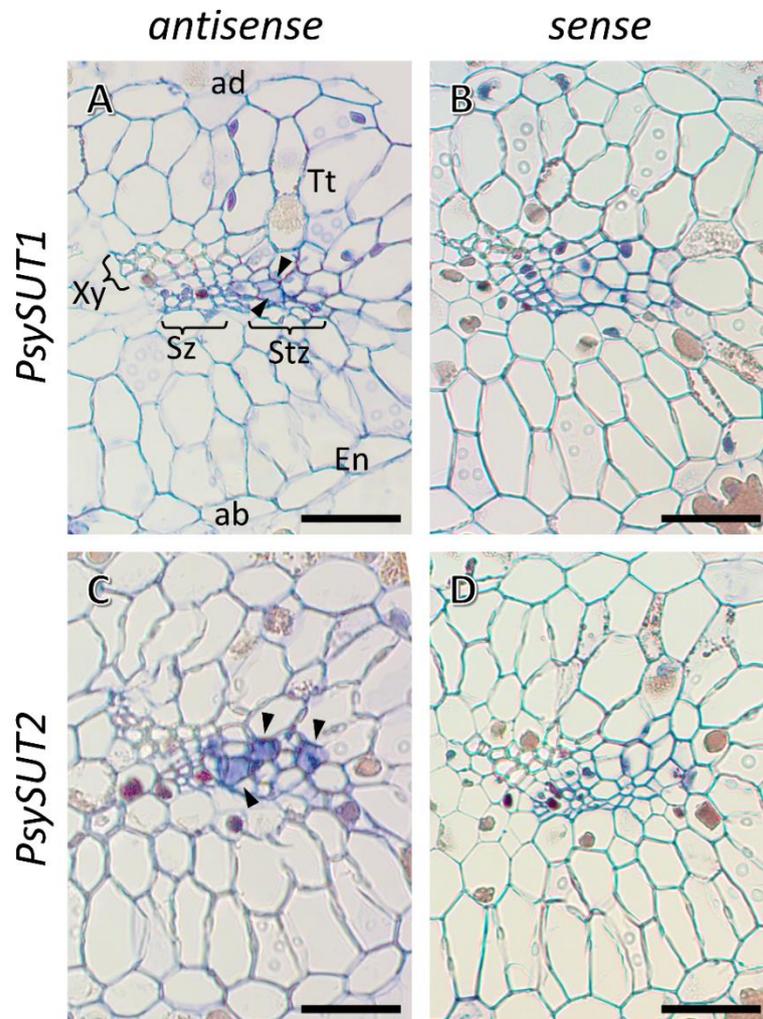
Durch die mRNA *in-situ*-Hybridisierung ist es möglich, ein Transkript an seinem Expressionsort zu visualisieren. Die zellgenaue Lokalisation des Transkripts kann damit Rückschlüsse auf die Funktion des Proteins geben. Um eine mögliche Rolle in der Beladung des Phloems zu finden, wurden adulte Nadeln und die Rinde eines jungen Zweiges eingebettet. Da sowohl *sink*-Nadeln als auch die generativen Organe, hier vor allem die männlichen Zapfen, eine stärkere Expression von *SUT1* gezeigt haben (Abbildung 20), wurden Dünnschnitte dieser Organe ebenfalls für die mRNA *in-situ*-Hybridisierung ausgewählt. Die Proben hierfür wurden in der Blütezeit von *P. sylvestris* gesammelt, welche je nach Witterungsbedingungen von Ende April bis Anfang Mai stattgefunden hat.

Für die Hybridisierungen wurden zwei verschiedene Sonden verwendet. Die *antisense*-Sonde richtet sich gegen die mRNA der entsprechenden SUT und sollte bei einer erfolgreichen Hybridisierung nach der Inkubation mit der Färbelösung zu einer Blaufärbung des Gewebes führen. Die *sense*-Sonde hingegen ist von ihrer Sequenz identisch mit der mRNA und kann dementsprechend nicht mit dem Transkript hybridisieren. Die Inkubation mit der *sense*-Sonde dient also dazu, unspezifische Färbungen zu erkennen. Nach einer Inkubation von 72 h zeigte sich bei allen *antisense* Hybridisierungen eine bläuliche Färbung. Als Positiv-Kontrolle wurden Schnitte mit einer *antisense*-Sonde für das konstitutiv exprimierte *GAPDH* hybridisiert (Bilder nicht gezeigt). Hier war die Blaufärbung ubiquitär im Gewebe verteilt. Die Hybridisierungen für die SUT-Sonden ergaben dagegen eine spezifischere Färbung, die je nach SUT und Gewebetyp unterschiedlich ausfiel.

#### 3.6.1 Zellspezifische Expression von *PsySUT1* und *PsySUT2* in *source*-Nadeln

Die Phloembeladung findet in Geweben statt, die photosynthetisch aktiv sind, also im *source*-Gewebe. Hierzu gehören bei *P. sylvestris* die adulten Nadeln. *Source*-Nadeln haben eine Gesamtlänge von etwa 4 – 8 cm und es sind im Querschnitt deutlich ausdifferenzierte Zellen erkennbar, insbesondere im Bereich des Zentralzylinders sind

Phloem und Xylem gut differenzierbar. Da die im Mesophyll produzierte Saccharose für den Zuckertransport weitergeleitet werden muss, ist eine Expression von Saccharosetransportern im *pre-phloem pathway* denkbar, weshalb die *source*-Nadeln für die Hybridisierung ausgewählt worden sind.



**Abbildung 21:** mRNA *in-situ*-Hybridisierung von *PsySUT1* und *PsySUT2* in Querschnitten von adulten Nadeln von *P. sylvestris*. Abgebildet ist jeweils die Hälfte des Zentralzylinders, der ein Leitbündel zeigt. Für den Nachweis von mRNA wurden die Schnitte mit *antisense*-Sonden hybridisiert (A, C), als Negativkontrolle wurden für die Hybridisierung *sense*-Sonden verwendet (B, D). Die Bereiche, in denen die Hybridisierung erfolgreich war, sind bläulich eingefärbt. *PsySUT1* (A) und *PsySUT2* (C) zeigten jeweils erfolgreichen Transkriptnachweis in einigen Strassburgerzellen (markiert mit Pfeilspitzen). ab: abaxial, ad: adaxial, En: Endodermis, Stz: Strassburgerzelle, Sz: Siebzelle, Tt: Transfusionsgewebe, Xy: Xylem. Die Maßstabsbalken entsprechen 50  $\mu$ m.

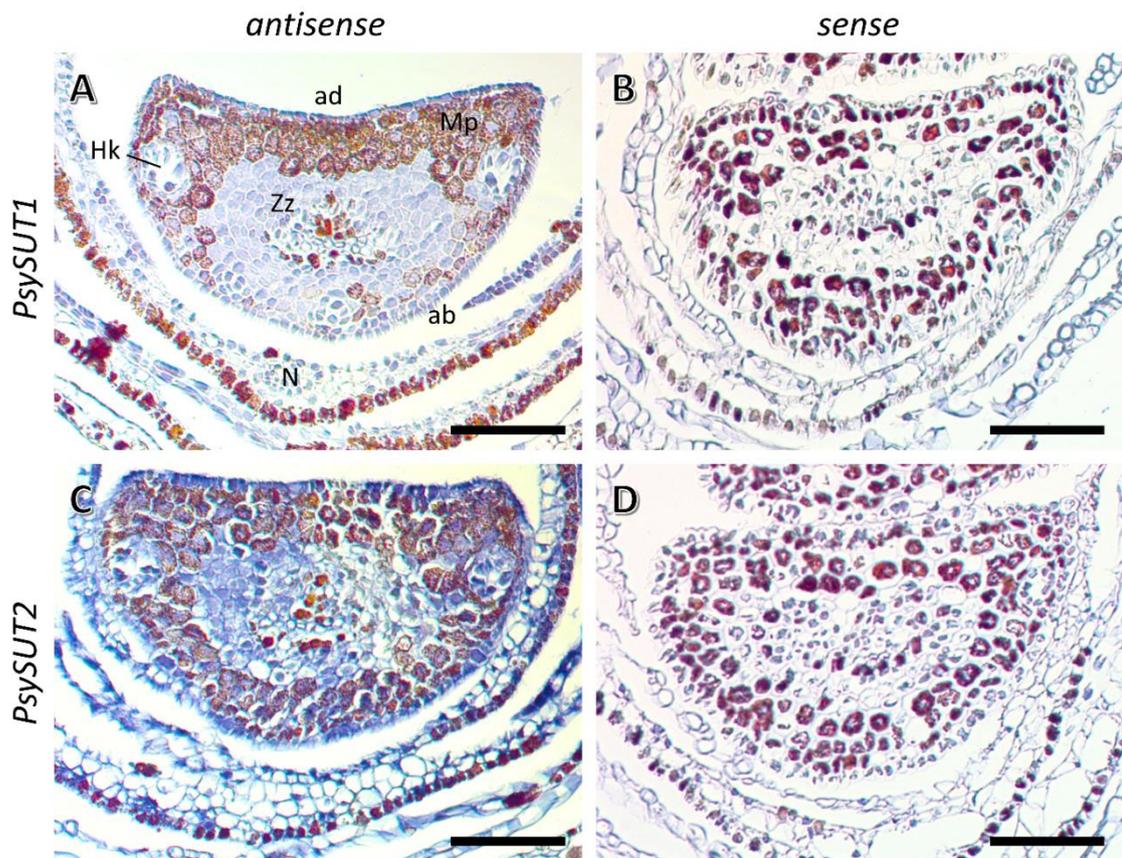
In den adulten Nadeln waren mit den *antisense* hybridisierten Sonden nur wenige Zellen angefärbt (Abbildung 21A, C). Die Anwesenheit von sowohl *SUT1* als auch *SUT2* Transkript zeigte sich im Bereich des Phloems. Dort waren die Strassburgerzellen angefärbt. Strassburgerzellen sind Zellen, die mit dem Phloem assoziiert sind. Sie befinden sich seitlich des Leitbündels am Rand der Siebzellen und sie verbinden das

Transfusionsparenchym mit den Siebzellen. Damit sind sie Teil des *pre-phloem pathways*. Erkennbar sind Strasburgerzellen anhand ihres Durchmessers, sie sind doppelt so groß wie die Siebzellen (Parameswaran und Liese, 1970). Die Färbung der Strasburgerzellen war bei den Schnitten, die mit *PsySUT2 antisense*-Sonde behandelt wurden, deutlich stärker als bei den Präparaten, die mit *PsySUT1* hybridisiert wurden. Bei den *sense* Proben wurde weder eine Färbung der Strasburgerzellen noch von anderen Zellen der Nadel festgestellt (Abbildung 21B, C).

### 3.6.2 Zellspezifische Expression von *PsySUT1* und *PsySUT2* in *sink*-Nadeln

Bevor Nadeln zu einem *source*-Organ werden, gehören sie zu Beginn ihrer Entwicklung zu den *sink*-Geweben, die auf dem Import von Saccharose angewiesen sind. Neben der Phloembeladung wurde die Beteiligung von SUT in der Phloementladung bereits in zahlreichen krautigen Pflanzen nachgewiesen (Kühn und Grof, 2010; Lemoine *et al.*, 2013). Die vorhergegangene Untersuchung der gewebespezifischen Expression zeigte vor allem bei *PsySUT1* eine höhere relative Expression in *sink*-Nadeln verglichen mit den *source*-Nadeln (Abbildung 20A). Aus diesem Grund wurden nicht nur adulte Nadeln, sondern auch junge Nadeln von *P. sylvestris* auf die zellspezifische Expression der *SUT*-Transkripte untersucht.

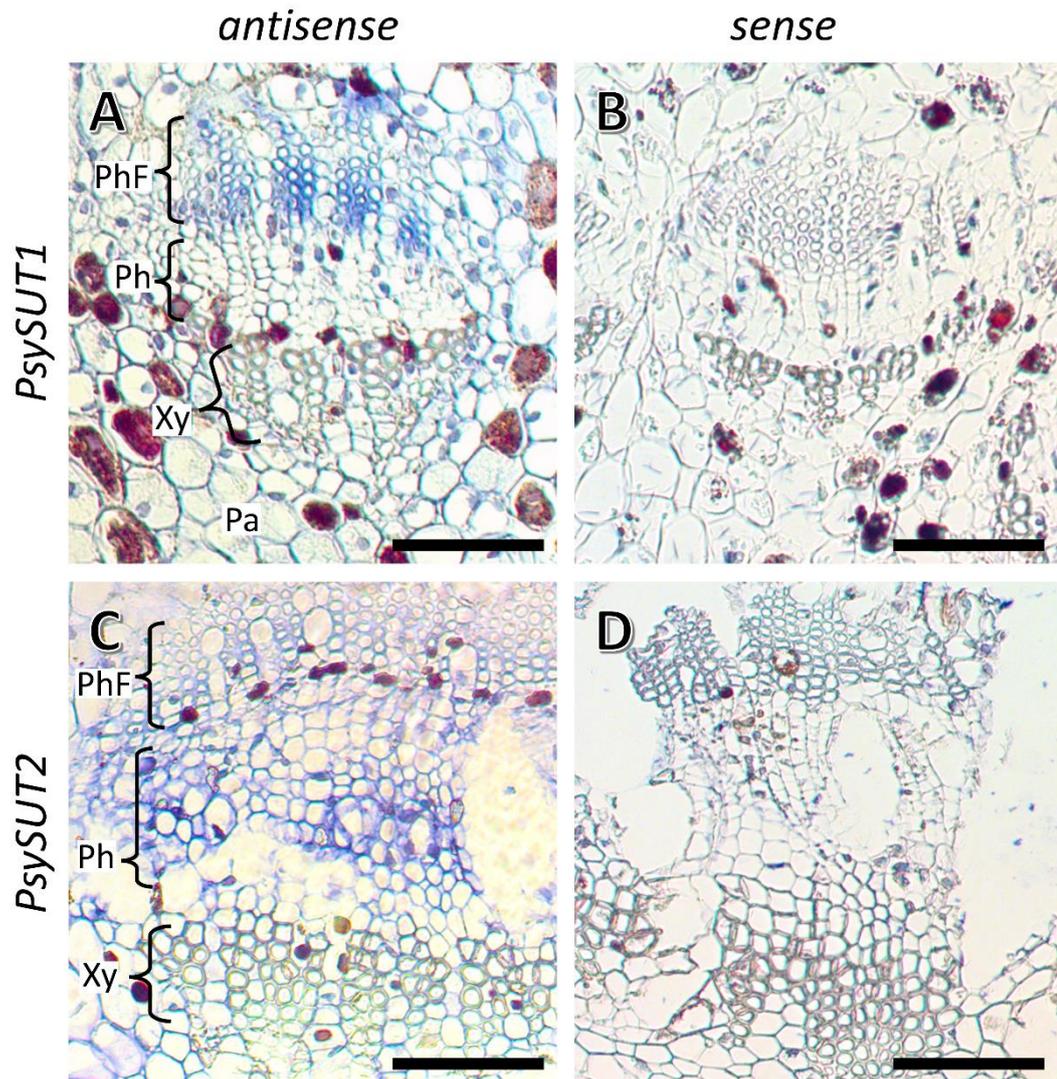
Da sich die Nadeln zum Sammelzeitpunkt noch zu zweit in der sie umgebenden Nadelscheide befanden, ist davon auszugehen, dass es sich hier um *sink*-Nadeln handelte. In den Gewebeschnitten von jungen, noch nicht entwickelten Nadeln ließ sich eine noch nicht endgültige Differenzierung der Zellen feststellen (Abbildung 22). Deutlich erkennbar waren aber schon kleine Hohlräume innerhalb des Mesophylls, an den Stellen, an denen später die Harzkanäle liegen. Der Zentralzylinder ließ sich dadurch erkennen, dass sich weniger Artefakte nach dem Fixieren gebildet haben als im Mesophyll, die Endodermis war noch nicht vollständig ausdifferenziert. Das Transkript von *SUT1* als auch von *SUT2* konnte hier ubiquitär in der gesamten jungen Nadel festgestellt werden, wobei die Färbung bei den Schnitten, die mit *SUT1* hybridisiert wurden, weniger intensiv waren als die Proben mit der *SUT2* Sonde, die ein kräftiges Blau aller Zellen zeigten (Abbildung 22A, C). Die Proben, die mit der *sense*-Sonde behandelt wurden, zeigten keine Hybridisierung im Gewebe.



**Abbildung 22: mRNA *in-situ*-Hybridisierung von *PsySUT1* und *PsySUT2* in Querschnitten von jungen Nadeln von *P. sylvestris*.** Abgebildet ist jeweils der Querschnitt durch eine junge, noch nicht vollständig ausdifferenzierte Nadel. Für den Nachweis von mRNA wurden die Schnitte mit *antisense*-Sonden hybridisiert (A, C), als Negativkontrolle wurden für die Hybridisierung *sense*-Sonden verwendet (B, C). Die Bereiche, in denen die Hybridisierung erfolgreich war, sind bläulich eingefärbt. *PsySUT1* (A) und *PsySUT2* (C) zeigten jeweils erfolgreichen Transkriptnachweis im kompletten Gewebe der jungen Nadel, wozu Epidermis, Mesophyll (Mp) und das Gewebe des Zentralzylinders (Zz) gehören. ab: abaxial, ad: adaxial, Hk: Harzkanal, N: Nadelscheide. Die Maßstabsbalken entsprechen 100  $\mu\text{m}$ .

### 3.6.3 Zellspezifische Expression von *PsySUT1* und *PsySUT2* im Leitgewebe der Sprossachse

Die Weiterleitung von Photoassimilaten findet im Transportphloem statt, welches in den Sprossachsen zu finden ist. In den Querschnitten von jungen, einjährigen Sprossachsen sah man noch einzelne, nicht zu einem Zylinder verschmolzene, offene kollaterale Leitbündel (Abbildung 23). Das Transkript von *PsySUT1* konnte hier in den Zellen der Phloemfasern festgestellt werden, die sich über dem Phloem befanden (Abbildung 23A). Phloemfasern unterschieden sich hier vom Phloem durch ihre deutlich verdickte Zellwand. Die Identifikation der Phloemfasern wurde durch Korrespondenz mit Prof. Dr. Stützel der Ruhr-Universität Bochum bestätigt. Die *antisense*-Sonde für *PsySUT2* konnte hingegen im Phloem hybridisieren und zeigte dort eine deutliche Blaufärbung des Gewebes (Abbildung 23C). Die Leitbündel, die mit der *sense*-Sonde hybridisiert wurden, zeigten in keinem Gewebe ein Signal (Abbildung 23B, D).

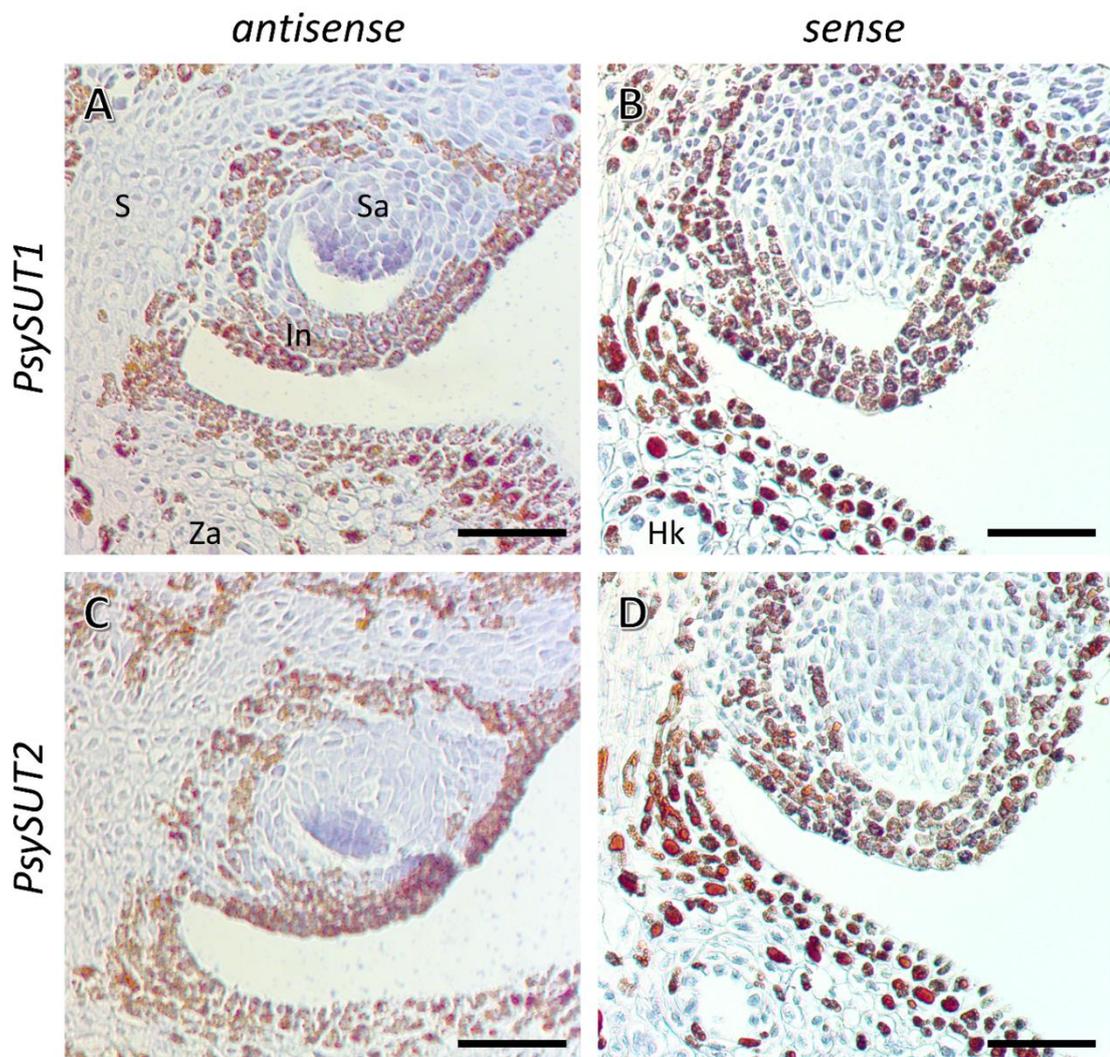


**Abbildung 23: mRNA *in-situ*-Hybridisierung von *PsySUT1* und *PsySUT2* in Querschnitten von einjährigen Sprossachsen von *P. sylvestris*.** Abgebildet sind die Leitbündel, die in den Sprossachsen vorkommen. Für den Nachweis von mRNA wurden die Schnitte mit *antisense*-Sonden hybridisiert (A, C), als Negativkontrolle wurden für die Hybridisierung *sense*-Sonden verwendet (B, C). Die Bereiche, in denen die Hybridisierung stattfand, sind bläulich eingefärbt. Für *PsySUT1* (A) war ein erfolgreicher Transkriptnachweis in den Phloemfasern (PhF) zu sehen, wohingegen das Signal der Sonde für *PsySUT2* (C) im darunter liegenden Phloem (Ph) zu sehen war. Die Identifikation der Phloemfasern erfolgte in Korrespondenz mit Prof. Dr. Stützel der Ruhr-Universität Bochum. Pa: Parenchym, Xy: Xylem. Die Maßstabsbalken entsprechen 100  $\mu\text{m}$ .

### 3.6.4 Zellspezifische Expression von *PsySUT1* und *PsySUT2* in weiblichen Zapfen

Neben den jungen Nadeln entwickelt *P. sylvestris* auch generative Organe, die auf den Import von Saccharose angewiesen sind. Dazu gehören die weiblichen Blütenstände, die wie bei allen Koniferen Zapfen genannt werden. Messungen der Expressionsstärke haben bereits gezeigt, dass in den weiblichen Zapfen Transkript von sowohl *PsySUT1* als auch *PsySUT2* zu finden war (Abbildung 20). Die Querschnitte der weiblichen Zapfen zeigten je eine Samenanlage, die Teil der Samenschuppe waren (Abbildung 24). Eine bläulich-violette Färbung, die auf eine erfolgreiche Hybridisierung hindeutet, zeigte sich sowohl

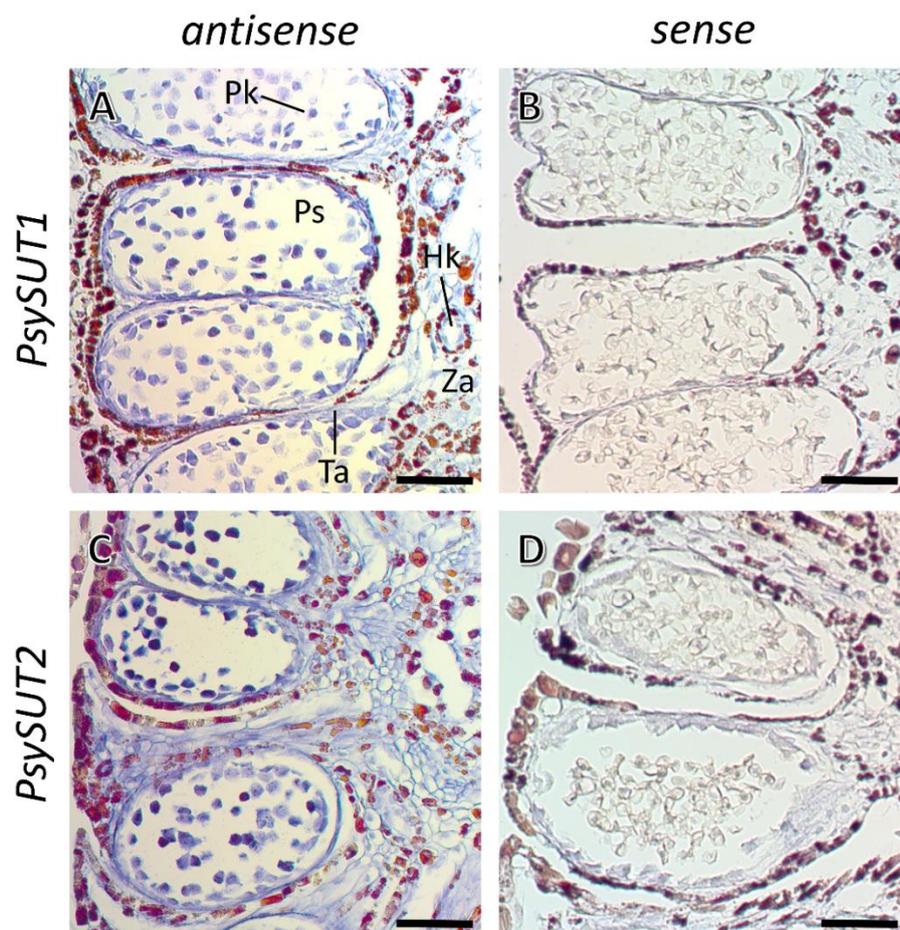
bei *SUT1* als auch bei *SUT2* an dem Ende der Samenanlage, das dem Integument zugewandt war (Abbildung 24A, C). Bei den Proben, die mit der *sense*-Sonde hybridisiert wurden, sieht man lediglich, dass das Gewebe im Bereich der Zellkerne deutlich überfärbt wurden (Abbildung 24B, D). Eine spezielle Färbung der Samenanlage, sowie komplett gefärbte Zellen, sieht man in den Negativkontrollen nicht.



**Abbildung 24: mRNA *in-situ*-Hybridisierung von *PsySUT1* und *PsySUT2* in Querschnitten von weiblichen Zapfen von *P. sylvestris*.** Abgebildet sind Teilbereiche des weiblichen Zapfens, welcher jeweils eine Samenanlage zeigt. Für den Nachweis von mRNA wurden die Schnitte mit *antisense*-Sonden hybridisiert (A, C), als Negativkontrolle wurden für die Hybridisierung *sense*-Sonden verwendet (B, D). Die Bereiche, in denen die Hybridisierung erfolgreich war, sind bläulich eingefärbt. *PsySUT1* (A) und *PsySUT2* (C) zeigten jeweils erfolgreichen Transkriptnachweis im Bereich der Samenanlage (Sa). Hk: Harzkanal, In: Integument, S: Samenschuppe, Za: Zapfenachse. Die Maßstabsbalken entsprechen 100  $\mu$ m.

### 3.6.5 Zellspezifische Expression von *PsySUT1* und *PsySUT2* in männlichen Zapfen

Als einhäusige Pflanze trägt *P. sylvestris* nicht nur weibliche, sondern auch männliche Zapfen. Wie zuvor zeigte auch dieses Gewebe in den Expressionsanalysen Transkriptvorkommen beider *SUT*, sodass es auch bei den Untersuchungen zur zellspezifischen Expression einbezogen werden konnte. Bei den Schnitten der männlichen Zapfen, die mit der *antisense*-Sonde zu *PsySUT1* und *PsySUT2* inkubiert wurden, konnte ein bestimmtes Hybridisierungsmuster festgestellt werden (Abbildung 25A, C). Hier zeigte sich eine starke blaue Färbung vor allem in den Pollenkörnern, die sich innerhalb eines noch nicht aufgeplatzten Pollensacks befanden. Auch das Tapetum, die Nährschicht innerhalb eines Pollensacks, wies ein deutliches Hybridisierungssignal auf. Die Objektträger, die mit der *sense*-Sonde zu *SUT1* und *SUT2* behandelt wurden, zeigen keine Blaufärbung des Gewebes an (Abbildung 25B, D).



**Abbildung 25:** mRNA *in-situ*-Hybridisierung von *PsySUT1* und *PsySUT2* in Querschnitten von männlichen Zapfen von *P. sylvestris*. Abgebildet sind Teilbereiche des männlichen Zapfens mit Querschnitten durch die Pollensäcke (Ps). Für den Nachweis von mRNA wurden die Schnitte mit *antisense*-Sonde hybridisiert (A, C), als Negativkontrolle wurden für die Hybridisierung *sense*-Sonden verwendet (B, D). Die Bereiche, in denen die Hybridisierung erfolgreich war, sind bläulich eingefärbt. *PsySUT1* (A) und *PsySUT2* (C) zeigten jeweils erfolgreichen Transkriptnachweis in den einzelnen Pollenkörnern (Pk) und auch im Tapetum (Ta). Za: Zapfenachse. Die Maßstabsbalken entsprechen 100  $\mu$ m.

### 3.7 Subzelluläre Lokalisation von *PsySUT1* und *PsySUT2*

Neben der Plasmamembran können die membranständigen SUT auch am Tonoplasten der Vakuole liegen, wo sie bereits lokalisiert worden sind (Endler *et al.*, 2006). Zur Aufklärung der subzellulären Lokalisation der in dieser Arbeit identifizierten SUT wurden die Transportproteine mithilfe von Expressionsvektoren in *A. thaliana* Mesophyll-Protoplasten exprimiert. Dazu wurden die ORF-Sequenzen von *PsySUT1* und *PsySUT2* in je zwei Expressionsvektoren kloniert (pCS120 und pSS87, siehe Kapitel 2.7.7.2, Abbildung 15), sodass die Proteine am N- oder C-Terminus mit dem Fluorophor GFP markiert waren. Als Positivkontrolle für die Transformation wurde ein Konstrukt mit AtSUC2 verwendet, da dieser Transporter nachweislich an der Plasmamembran lokalisiert wurde (Stadler und Sauer, 1996). Als weitere Kontrolle wurden die beiden Leervektoren pCS120 und pSS87 in Protoplasten transformiert. Hier wurde anstatt eines Fusions-Proteins nur freies GFP exprimiert, welches im Cytosol vorlag. Der bereits erfolgreich exprimierte AtSUC2-Vektor als auch die leeren Plasmide pCS120 und pSS87 wurden freundlicherweise von Dr. Stadler (AG Pflanzenphysiologie, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg) zur Verfügung gestellt.

Auch nach mehrmaligen Transformationsversuchen war lediglich ein GFP-Signal in Protoplasten sichtbar, die mit den Leervektoren pCS120 oder pSS87 transformiert wurden. Das Fluoreszenzsignal konnte im Cytosol des Protoplasten wahrgenommen werden, da durch die Expression mit den Leervektoren freies GFP vorlag. Sowohl bei Protoplasten, die mit dem Positiv-Kontrollvektor AtSUC2, als auch bei Protoplasten, die mit den GFP-Fusions-Konstrukten für *PsySUT1* und *PsySUT2* transformiert worden sind, zeigten kein GFP-Signal (Daten nicht gezeigt).

### 3.8 Einfluss von Trockenstress auf den Zuckertransport in Bäumen

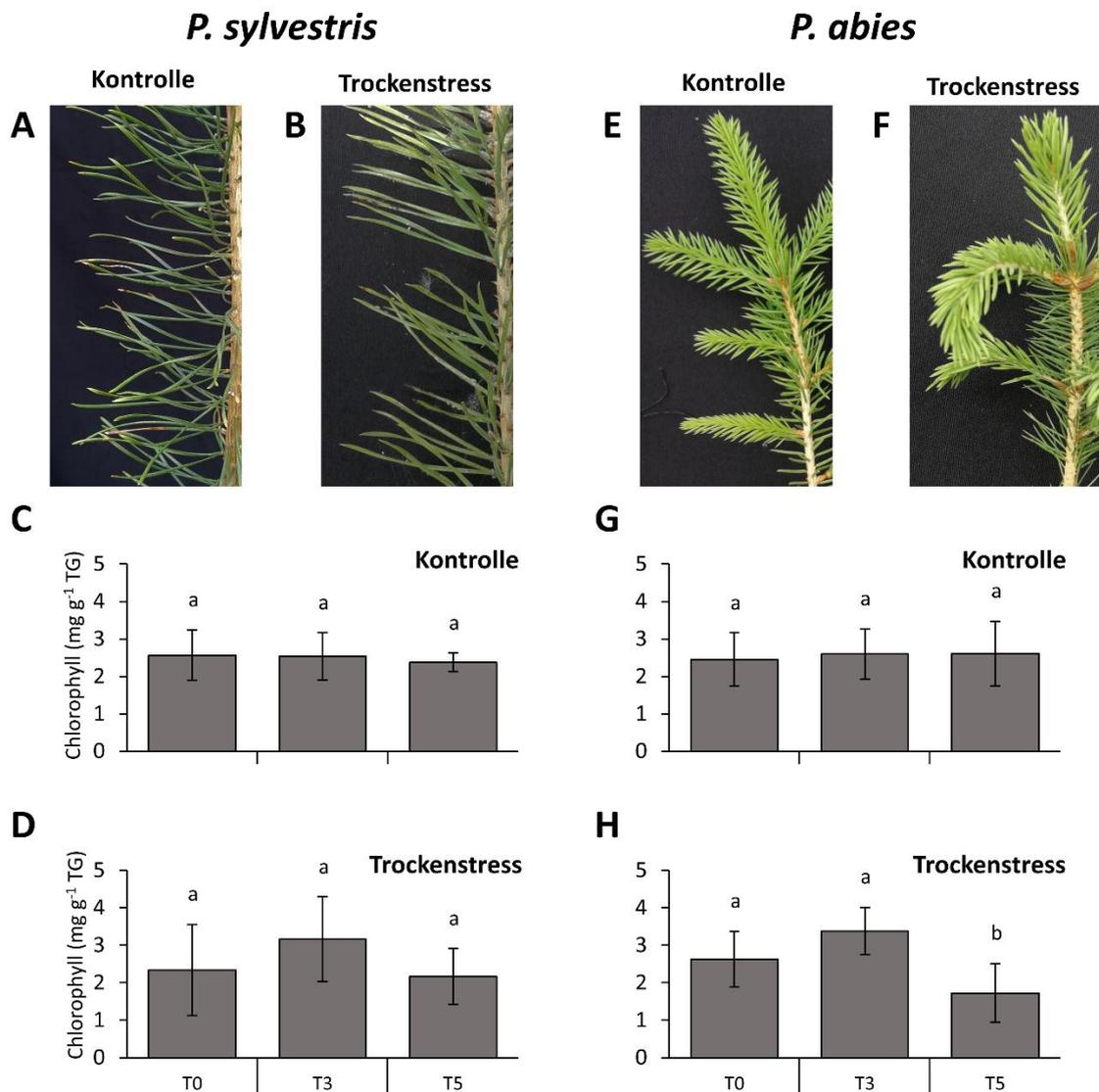
Die Produktion von nicht strukturellen Kohlenhydraten (*non-structural carbohydrates*, NSC) im *source*-Gewebe und deren Transport zum *sink*-Gewebe stellt für das Pflanzenwachstum und den Pflanzenstoffwechsel einen essenziellen Prozess dar und ist abhängig von einer effizienten Verteilung der Saccharose. Umweltfaktoren wie zum Beispiel Trockenstress haben einen maßgeblichen Einfluss auf den Zuckergehalt und den Zuckermetabolismus. Ob SUT in Bäumen an diesem Prozess beteiligt sind, ist bisher noch wenig untersucht. Deshalb wurde der Einfluss von Trockenstress auf die Expression der SUT in zwei Vertretern der Pinaceae, *Pinus sylvestris* und *Picea abies*, als auch in zwei Vertretern der Fagaceae, *Quercus robur* und *Fagus sylvatica* untersucht. Auch der Gehalt an Zucker, Stärke, anorganischen Ionen und Wasser wurde in den Geweben Blatt bzw. Nadeln, Rinde und Holz analysiert. In den Blättern und Nadeln wurde zusätzlich der Chlorophyllgehalt bestimmt und es wurden Fotos aufgenommen, die das Laub bzw. die Nadeln zum jeweils letzten Sammelzeitpunkt zeigten (T5 bei den Pinaceae, T3 bei den Fagaceae).

#### 3.8.1 Trockenstress in *P. sylvestris* und *P. abies*

Im ersten Abschnitt werden die Ergebnisse zu den zwei untersuchten Vertretern der Pinaceae, *P. sylvestris* und *P. abies* gezeigt. Die Bilder der Pflanzen zeigen den Zustand der Versuchsbäume nach fünf Wochen ohne Wasserzufuhr, Abbildungen 26A und E zeigen jeweils einen Teilspross einer Kontrollpflanze, wohingegen in den Abbildungen 26B und F jeweils ein Teil der Trockenstresspflanze zu sehen ist. Bei *P. sylvestris* gab es keinen deutlichen Unterschied zwischen Kontroll- und Trockenstresspflanze (Abbildung 26A, B). Beide Aufnahmen zeigen ein ähnlich sattes Grün der Nadeln und es sind keine Symptome der Welke erkennbar. Die Messung des Chlorophyllgehalts bei den Kontroll- und Trockenstresspflanzen zeigte einen konstanten Gehalt mit 2 – 3 mg Chlorophyll pro g Trockengewicht (Abbildung 26C, D).

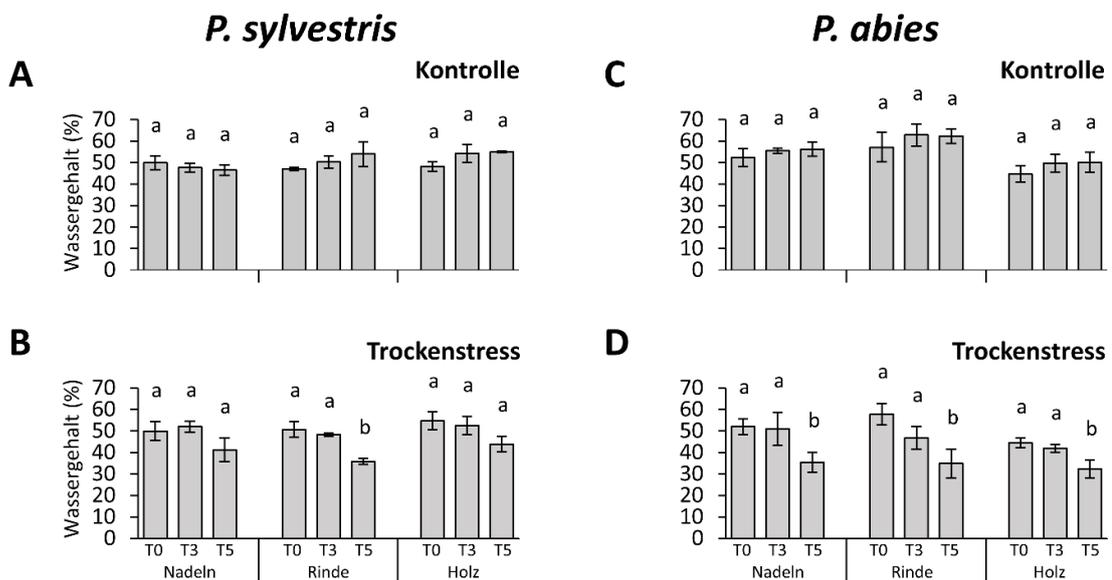
Anders als bei *P. sylvestris* konnte bei *P. abies* ein deutlicher Unterschied von Kontroll- und Trockenstresspflanzen festgestellt werden. Die Aufnahmen einer Trockenstresspflanze zeigten, dass die einjährigen Seitentriebe schlaff herabhingen und damit deutliche Symptome der Welke feststellbar waren (Abbildung 26F). Im Gegensatz dazu zeigte der Seitentrieb der Kontrollpflanze keinerlei Welke (Abbildung 26E). Bei den Trockenstresspflanzen war das Blattgrün deutlich blasser und gelblicher verglichen mit

den Kontrollpflanzen, deren Nadeln kräftig grün gefärbt waren. Die Abnahme des Blattgrüns ließ sich nicht nur optisch wahrnehmen, sondern auch der Chlorophyllgehalt war deutlich reduziert. Während die Nadeln der Kontrollpflanzen einen durchschnittlichen Chlorophyllgehalt von 2,5 mg/g TG während des gesamten Versuchsverlaufes aufwiesen (Abbildung 26G), veränderte sich der Chlorophyllgehalt in den Trockenstresspflanzen nach fünf Wochen ohne Bewässerung auf etwa 1,7 mg Chlorophyll pro g Trockengewicht und war damit signifikant geringer als bei den Sammelzeitpunkten davor (Abbildung 26H).



**Abbildung 26: Veränderungen im Habitus und im Chlorophyllgehalt in zwei Vertretern der Pinaceae unter Trockenstress.** Dargestellt sind Fotos der Nadeln von *P. sylvestris* (A-B) und *P. abies* (E-F) gesammelt von Kontroll- (A, E) und Trockenstresspflanzen (B, F) zum Zeitpunkt T5. Gemessen wurde ebenfalls der Chlorophyllgehalt in den Nadeln der Kontroll- (C-D) und Trockenstresspflanzen (G-H). Unterschiedliche Buchstaben stellen signifikante Unterschiede im Chlorophyllgehalt dar (Tukey's HSD;  $p < 0,05$ ). Mittelwerte  $\pm$  SD,  $n = 6$

Zu den weiteren untersuchten Parametern gehörte auch der Wassergehalt in den Geweben Nadeln, Rinde und Holz. Bei *P. sylvestris* hatten die Kontrollpflanzen in allen Geweben während des Sammelzeitraumes einen durchschnittlichen Wassergehalt von 48 bis 55 % (Abbildung 27A). Bei den Trockenstresspflanzen lag der Wassergehalt in allen Organen zum Sammelzeitpunkt T0 zwischen 49 und 55 %. Zum letzten Sammelzeitpunkt T5 gab es in allen Geweben einen deutlich geringeren Wassergehalt, bei den Nadeln betrug dieser nur noch 41 % und beim Holz ist er auf 44 % gesunken, jedoch sind in beiden Geweben die niedrigeren Werte nicht statistisch signifikant niedriger. In der Rinde ist der Wassergehalt auf 35 % gesunken. Dieser Wert ist statistisch signifikant geringer verglichen mit den Wassergehalten der vorherigen Sammelzeitpunkte T0 und T3 (Abbildung 27B).

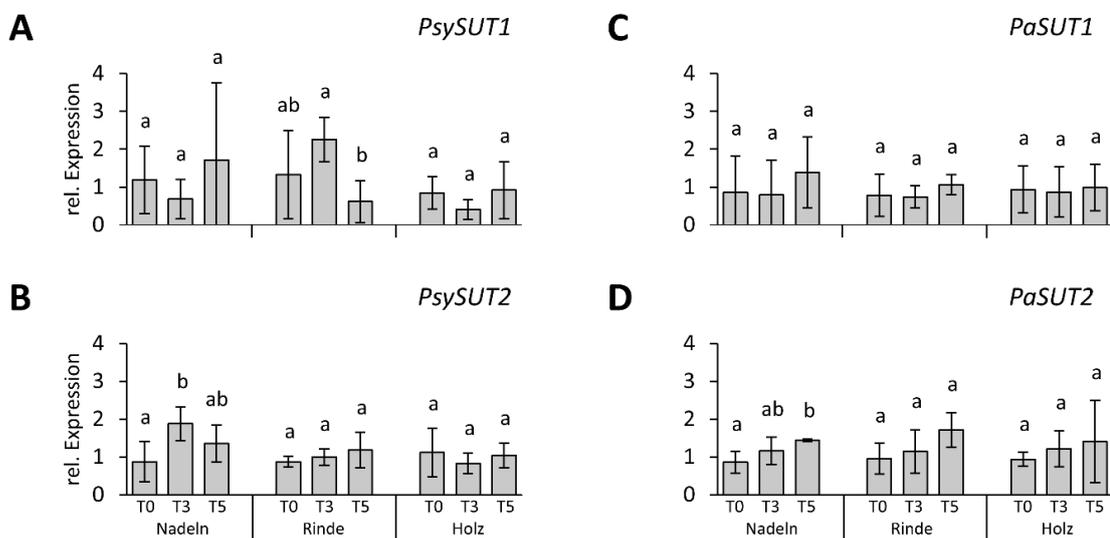


**Abbildung 27: Veränderung des Wassergehalts in zwei Vertretern der Pinaceae unter Trockenstress.** Dargestellt ist der prozentuale Wassergehalt von *P. sylvestris* (A-B) und *P. abies* (C-D) in den Organen Nadeln, Rinde und Holz der Kontroll- (A, C) und Trockenstresspflanzen (B, D). Unterschiedliche Buchstaben stellen signifikante Unterschiede im Wassergehalt dar (Tukey's HSD;  $p < 0,05$ ). Mittelwerte  $\pm$  SD,  $n = 6$

Der Wassergehalt in den Kontrollpflanzen von *P. abies* blieb während des Versuches konstant. Er betrug in den Nadeln zwischen 52 und 56 %, in der Rinde 58 bis 62 % und im Holz konnte ein Wassergehalt von 45 bis 50 % gemessen werden. (Abbildung 27C). Bei den Trockenstresspflanzen von *P. abies* konnte im Laufe des Versuches eine Abnahme im Wassergehalt festgestellt werden. Nach fünf Wochen ohne Wasser fiel der Wassergehalt sowohl in den Nadeln als auch in der Rinde auf 35%, im Holz konnte zum Schluss ein Wassergehalt von 32 % gemessen werden (Abbildung 27D).

### 3.8.2 Expression von SUT in *P. sylvestris* und *P. abies* unter dem Einfluss von Trockenstress

Um den Einfluss von Trockenstress auf die Expression der SUT zu untersuchen, wurden qPCR-Messungen für die zwei in dieser Arbeit identifizierten SUT-Sequenzen aus *P. sylvestris*, *PsySUT1* und *PsySUT2*, durchgeführt. Zum Vergleich wurde ebenfalls die Expression von *SUT1* und *SUT2* aus *P. abies* gemessen. Normalisiert wurde die Expression bei *P. sylvestris* gegen das *housekeeping gene* (HKG) *GAPDH*, bei *P. abies* wurde dafür *EF1a* verwendet. Als Kalibrator wurde für jeden Sammelzeitpunkt die Kontrollprobe ausgewählt und auf einen Wert von 1 gesetzt.



**Abbildung 28: Veränderung der Expression von SUT in zwei Vertretern der Pinaceae unter Trockenstress.** Gemessen wurde die relative Expression von *SUT1* (A, C) und *SUT2* (B, D) in den Organen Nadeln, Rinde und Holz von *P. sylvestris* (A-B) und *P. abies* (C-D). Unterschiedliche Buchstaben stellen signifikante Unterschiede in den Expressionsniveaus dar (Tukey's HSD;  $p < 0,05$ ). Mittelwerte  $\pm$  SD,  $n = 6$

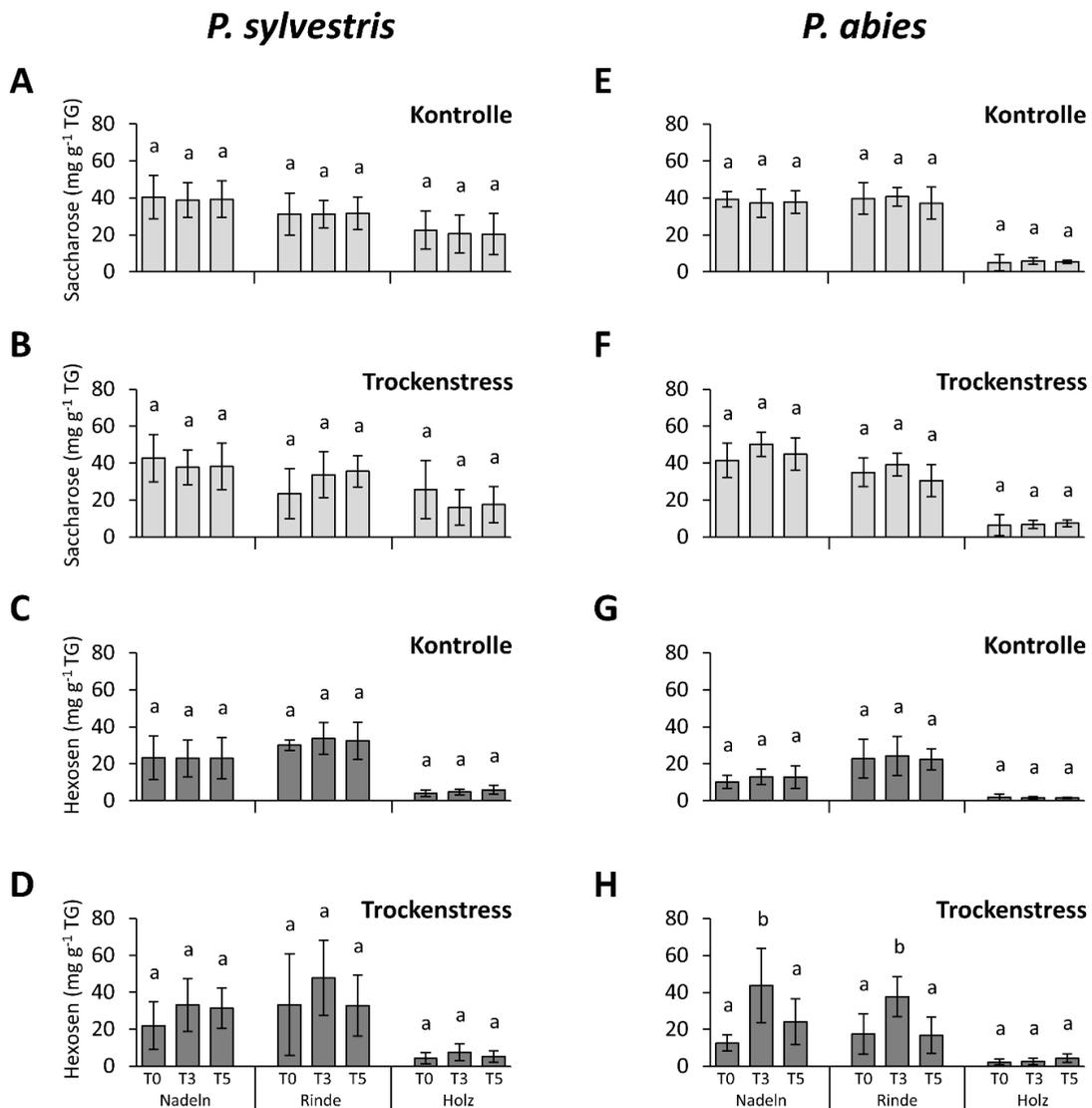
Die Expression von *PsySUT1* zeigte in allen Geweben von *P. sylvestris* starke Schwankungen in den Einzelproben und entsprechend hohe Standardabweichungen. Vor allem in den Nadeln waren nach fünf Wochen Trockenstress die Einzelwerte deutlich abweichend, im Mittel jedoch blieb die relative Expression unter einem Wert von 2. Die Schwankungen in der Expression stellten sich statistisch als nicht signifikant heraus. Die relative Expression hatte in der Rinde zum Start des Experiments einen Wert von 1,3, stieg dann nach drei Wochen auf das Doppelte an, um nach fünf Wochen auf fast 0,5 abzufallen. Die Abnahme der Expression von dem Sammelzeitpunkt T3 zu dem Sammelzeitpunkt T5 ist dabei statistisch signifikant. Die relative Expression im Holz stieg im Mittel nie über 1 und befand sich nach drei Wochen auf ihrem Tiefpunkt. Genau

wie bei den Nadeln konnte auch im Holz keine statistisch signifikante Änderung der Expressionsstärke von *PsySUT1* gemessen werden (Abbildung 28A). Anders als *PsySUT1* zeigte *PsySUT2* deutlich weniger starke Schwankungen in der relativen Expressionsstärke. Vor allem in Rinde und Holz von *P. sylvestris* sind keine signifikanten Änderungen der Expression von *PsySUT2* erkennbar, die relative Expression blieb über den Versuchszeitraum in diesen Organen bei einem Wert von 1. Jedoch ist in der Nadel eine Zunahme an Expression erkennbar, hier stieg die Expression nach drei Wochen ohne Bewässerung der Trockenstresspflanzen auf das Doppelte an, was eine statistisch signifikante Zunahme an Transkript darstellt. Zu dem Sammelzeitpunkt T5 ist die relative Expression leicht abgefallen auf 1,5 (Abbildung 28B).

Im Vergleich zu den Kontrollpflanzen ist die Expression von *PaSUT1* in den Pflanzen, die dem Trockenstress ausgesetzt waren, ähnlich konstant. So gab es keine signifikanten Änderungen der Expression in den untersuchten Organen in *P. abies*, die Expression schwankt zwischen 1 und 1,3 (Abbildung 28C). In den Untersuchungen zu der Expression von *PaSUT2* stellte sich heraus, dass die Expression nach fünf Wochen ohne Bewässerung der Trockenstresspflanzen in den Nadeln einen statistisch signifikanten Anstieg zeigten verglichen zu der Expression zum Startzeitpunkt. In den Organen Rinde und Holz konnte aufgrund der höheren Standardabweichung keine signifikante Änderung der Expression von *PaSUT2* festgestellt werden, obwohl die Expression zum Sammelzeitpunkt T5 in der Rinde mit 1,7 am höchsten war (Abbildung 28D).

### **3.8.3 Zucker- und Stärkegehalte in *P. sylvestris* und *P. abies* unter dem Einfluss von Trockenstress**

Der Einfluss von Trockenstress auf den Zucker- und Stärkegehalt in den verschiedenen Geweben von *P. sylvestris* und *P. abies* wurde ebenfalls untersucht. Bei den beiden untersuchten Arten waren die hauptsächlich vorkommenden löslichen Zucker Glukose, Fruktose und Saccharose, wobei hier Glukose und Fruktose aufaddiert als Hexosen dargestellt werden (Abbildung 29C-D, G-H).



**Abbildung 29: Veränderung des Zuckergehalts in zwei Vertretern der Pinaceae unter Trockenstress.** Gemessen wurde der Gehalt an Saccharose (A-B, E-F) und den Hexosen (C-D, G-H) in den Organen Nadeln, Rinde und Holz von *P. sylvestris* (A-D) und *P. abies* (E-H). Die Hexosen sind jeweils die Summe aus den gemessenen Daten zu Glukose und Fruktose. Dargestellt sind die Diagramme der Trockenstresspflanzen, die während des Versuchszeitraumes nicht gewässert wurden (B, D, F, H) und die dazugehörigen Kontrollpflanzen, die ausreichend mit Wasser versorgt wurden (A, C, E, G). Unterschiedliche Buchstaben stellen signifikante Unterschiede im Saccharose- oder Hexosegehalt dar (Tukey's HSD;  $p < 0,05$ ). Mittelwerte  $\pm$  SD,  $n = 6$

Bei *P. sylvestris* wurde der höchste Saccharosegehalt mit im Mittel 40 mg/g TG in den Nadeln festgestellt, gefolgt von der Rinde mit 30 mg/g TG und zuletzt Holz mit 20 mg/g TG. In den Kontrollpflanzen konnten keine signifikanten Änderungen während des gesamten Trockenstressexperiments festgestellt werden, die Werte des Saccharosegehalts blieben auf einem konstanten Niveau (Abbildung 29A). In den Trockenstresspflanzen konnte ein vergleichbarer Saccharosegehalt in allen Geweben während des Trockenstressversuchs nachgewiesen werden. Auch hier konnten keine statistisch

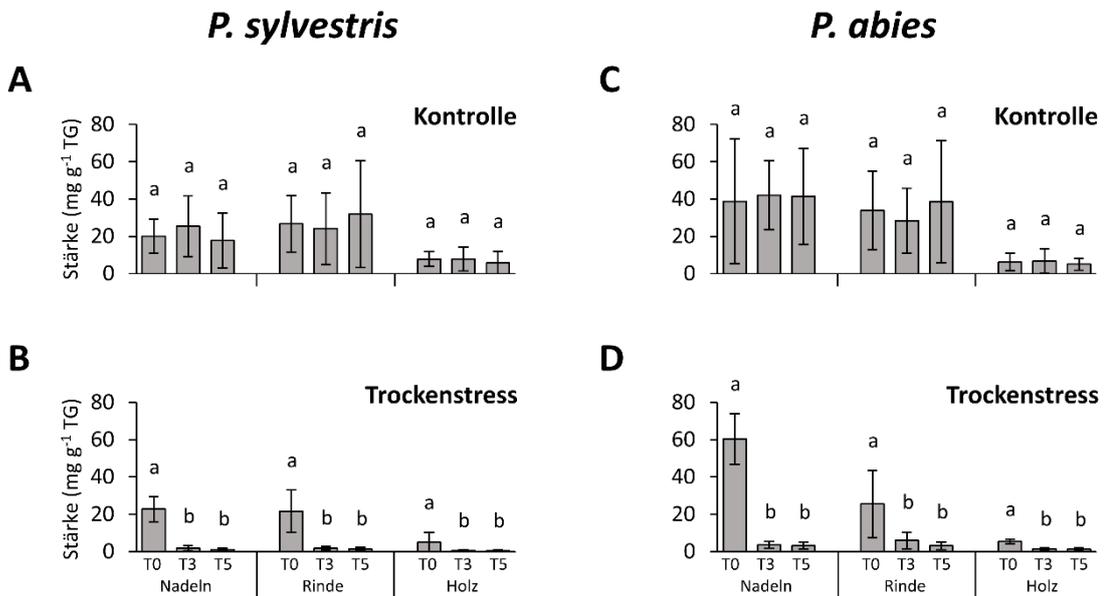
signifikanten Änderungen im Verlauf des Versuches festgestellt werden (Abbildung 29B).

Bei den Hexosen, die in den Geweben von *P. sylvestris* gemessen wurden, befand sich der höchste Gehalt in der Rinde, hier haben die Kontrollpflanzen während des Trockenstressexperiments einen Hexosegehalt von 30 bis 34 mg/g TG. In den Nadeln wurde ein Hexosegehalt von 23 mg/g TG nachgewiesen. Im Holz war mit 5 bis 7 mg/g TG der Gehalt an Hexosen am geringsten (Abbildung 29C). In den Werten für die Hexosen in den untersuchten Geweben der Kontrollpflanzen gab es keine starken Schwankungen und es konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede der Werte im Versuchszeitraum ermittelt werden. Die Proben, die von den Trockenstresspflanzen gesammelt wurden, zeigten einen ähnlichen Hexosegehalt in den Organen. Neben der Rinde waren auch in den Geweben Nadeln und Holz während des Versuchszeitraumes keine statistisch signifikanten Änderungen zu verzeichnen (Abbildung 29D).

In den Kontrollpflanzen von *P. abies* blieb der Saccharosegehalt während des gesamten Versuchs konstant. Der Gehalt an Saccharose war in den Nadeln und der Rinde mit 38 bis 41 mg/g TG in beiden Organen sehr ähnlich. Im Holz lag der Saccharosegehalt deutlich geringer, dieser betrug zwischen 7 und 9 mg/g TG (Abbildung 29E). Der Gehalt an Saccharose in allen untersuchten Organen war in den Trockenstresspflanzen vergleichbar mit dem Saccharosegehalt in den Kontrollpflanzen. Genau wie in den Kontrollproben konnten bei den Trockenstressproben von *P. abies* keine statistisch signifikanten Unterschiede im Saccharosegehalt festgestellt werden (Abbildung 29F).

Der Gehalt an Hexosen in *P. abies* war in der Rinde am höchsten, in den Kontrollpflanzen wurden im Mittel 24 bis 26 mg/g TG während der unterschiedlichen Messzeitpunkte nachgewiesen. In den Nadeln waren mit 10 bis 14 mg/g TG etwas weniger Hexosen im Gewebe. Im Holz betrug der Hexosegehalt während des Experiments etwa 3 mg/g TG. Zwischen den verschiedenen Sammelzeitpunkten konnte bei den Kontrollpflanzen keine statistisch signifikanten Unterschiede im Hexosegehalt festgestellt werden (Abbildung 29G). Zu Beginn des Trockenstressexperiments wurde in der Rinde der Trockenstresspflanzen mit 20 mg/g TG der höchste Startwert gemessen. Nach drei Wochen ohne Bewässerung stieg der Hexosegehalt auf 40 mg/g TG signifikant stark an und war damit doppelt so hoch wie der Wert zum Startzeitpunkt T<sub>0</sub>. Nach fünf Wochen ohne Bewässerung fiel der Hexosegehalt jedoch wieder auf 20 mg/g TG ab. In den Nadeln wurden zum Zeitpunkt T<sub>0</sub> etwa 12 mg/g TG an Hexosen im Gewebe gemessen. Nach

drei Wochen ohne Bewässerung stieg der Hexosegehalt auf über das Dreifache des Startwertes an. Zum letzten Sammelzeitpunkt war der Hexosegehalt in den Nadeln der Trockenstresspflanzen auf 25 mg/g TG gesunken. Lediglich beim Holz gab es keine signifikante Veränderung im Hexosegehalt. (Abbildung 29H).



**Abbildung 30: Veränderung des Stärkegehalts in zwei Vertretern der Pinaceae unter Trockenstress.** Gemessen wurde der Gehalt an Stärke in den Organen Nadeln, Rinde und Holz von *P. sylvestris* (A-B) und *P. abies* (C-D). Dargestellt sind die Diagramme der Trockenstresspflanzen, die während des Versuchszeitraumes nicht gewässert wurden (B, D) und die dazugehörigen Kontrollpflanzen, die ausreichend mit Wasser versorgt wurden (A, C). Unterschiedliche Buchstaben stellen signifikante Unterschiede im Stärkegehalt dar (Tukey's HSD;  $p < 0,05$ ). Mittelwerte  $\pm$  SD,  $n = 6$

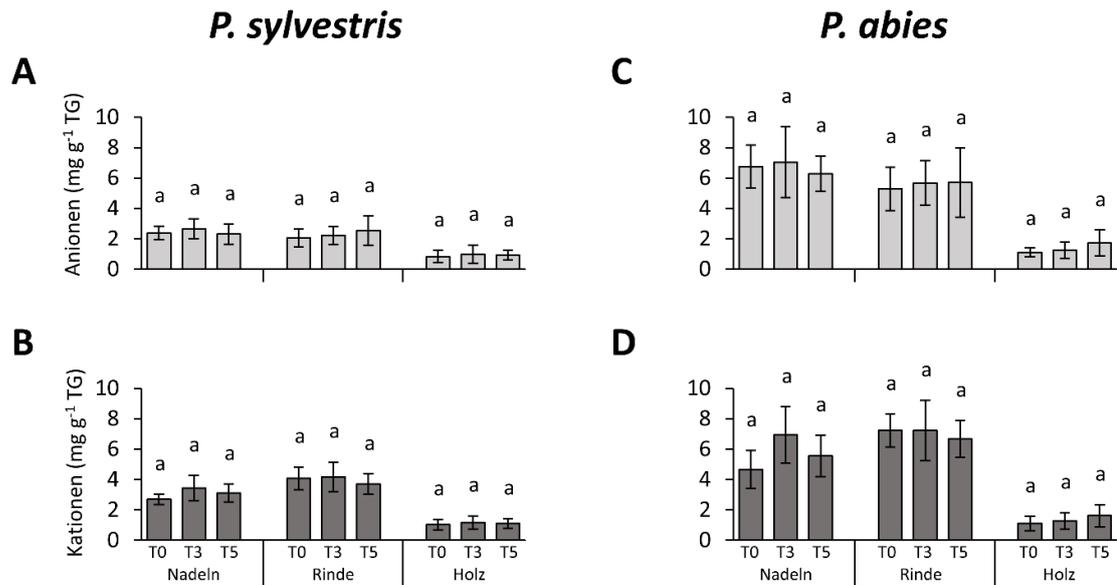
Der Stärkegehalt in den Proben der Gewebe Nadeln, Rinde und Holz von *P. sylvestris* und *P. abies*, die für das Trockenstressexperiment gesammelt wurden, wurde ebenfalls bestimmt. In den Kontrollpflanzen von *P. sylvestris* wurden in Nadeln und Rinde ähnlich hohe Stärkegehalte bestimmt. In den Nadeln wurde ein Stärkegehalt zwischen 20 und 25 mg/g TG und in der Rinde 25 bis 31 mg/g TG nachgewiesen. Im Holz ist der geringste Stärkegehalt mit nur 6 bis 8 mg/g TG gemessen worden. In den Kontrollproben konnte während des gesamten Versuchszeitraumes kein signifikanter Unterschied im Stärkegehalt gemessen werden (Abbildung 30A). Bei den Trockenstresspflanzen jedoch konnte in allen untersuchten Geweben bereits nach drei Wochen ohne Bewässerung eine signifikante Abnahme des Stärkegehalts beobachtet werden. Sowohl in den Nadeln als auch in der Rinde der Trockenstresspflanzen nahm der Stärkegehalt nach drei Wochen ohne Bewässerung auf 2 mg/g TG ab und blieb auch nach fünf Wochen ohne Bewässerung niedrig. Auch im Holz konnte zum Zeitpunkt T3 ein signifikanter Verlust

im Stärkegehalt gemessen werden, der nach fünf Wochen ohne Wasserzufuhr bei unter 1 mg Stärke pro g Trockengewicht lag (Abbildung 30B).

In den Kontrollpflanzen von *P. abies* war der Stärkegehalt in Nadeln und Rinde deutlich höher als im Holz. In den Nadeln waren es durchschnittlich zwischen 39 und 41 mg/g TG, in der Rinde schwankten die Werte während des Experiments zwischen 29 und 39 mg/g TG. Im Holz hingegen konnte nur ein Stärkegehalt von 5 bis 8 mg/g TG nachgewiesen werden (Abbildung 30C). In den Trockenstresspflanzen hingegen konnte in allen untersuchten Geweben bereits ab drei Wochen ohne Bewässerung eine statistisch signifikante Abnahme des Stärkegehalts gemessen werden. In den Nadeln fiel der Stärkegehalt nach drei Wochen ohne Wasser bereits auf 3 mg/g TG ab und blieb danach konstant. In der Rinde konnte eine Abnahme des Stärkegehalts auf 8 mg/g TG gemessen werden, die nach fünf Wochen ohne Bewässerung noch weiter abnahm. Im Holz konnte nach drei Wochen Trockenstress nur noch ein Stärkegehalt von unter 1 mg/g TG nachgewiesen werden (Abbildung 30D).

#### **3.8.4 Anorganische Ionen in *P. sylvestris* und *P. abies* unter dem Einfluss von Trockenstress**

Die Messungen der anorganischen Ionen sind jeweils als Summe der Anionen ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{PO}_4^{2-}$  und  $\text{SO}_4^{2-}$ ) bzw. als Summe der Kationen ( $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ) der Trockenstresspflanzen dargestellt. Weder bei *P. sylvestris* noch bei *P. abies* gab es signifikante Veränderungen der Anionen- oder Kationengehalte während des Trockenstressexperiments (Abbildung 31). Der Gehalt an anorganischen Anionen ist in *P. sylvestris* deutlich geringer als in *P. abies* (Abbildung 31A, C). Der Anionengehalt, der in den Trockenstresspflanzen von *P. sylvestris* gemessen wurde, betrug in Nadeln und Rinde ca. 2 mg/g TG, im Holz waren es nur knapp 1 mg/g TG (Abbildung 31A). In *P. sylvestris* war der Kationengehalt etwas höher als der Anionengehalt. In den Nadeln betrug der Gehalt an anorganischen Kationen etwa 3 mg/g TG, in der Rinde 4 mg/g TG und Holz zeigte mit 1 mg/g TG den geringsten Kationengehalt. (Abbildung 31B).



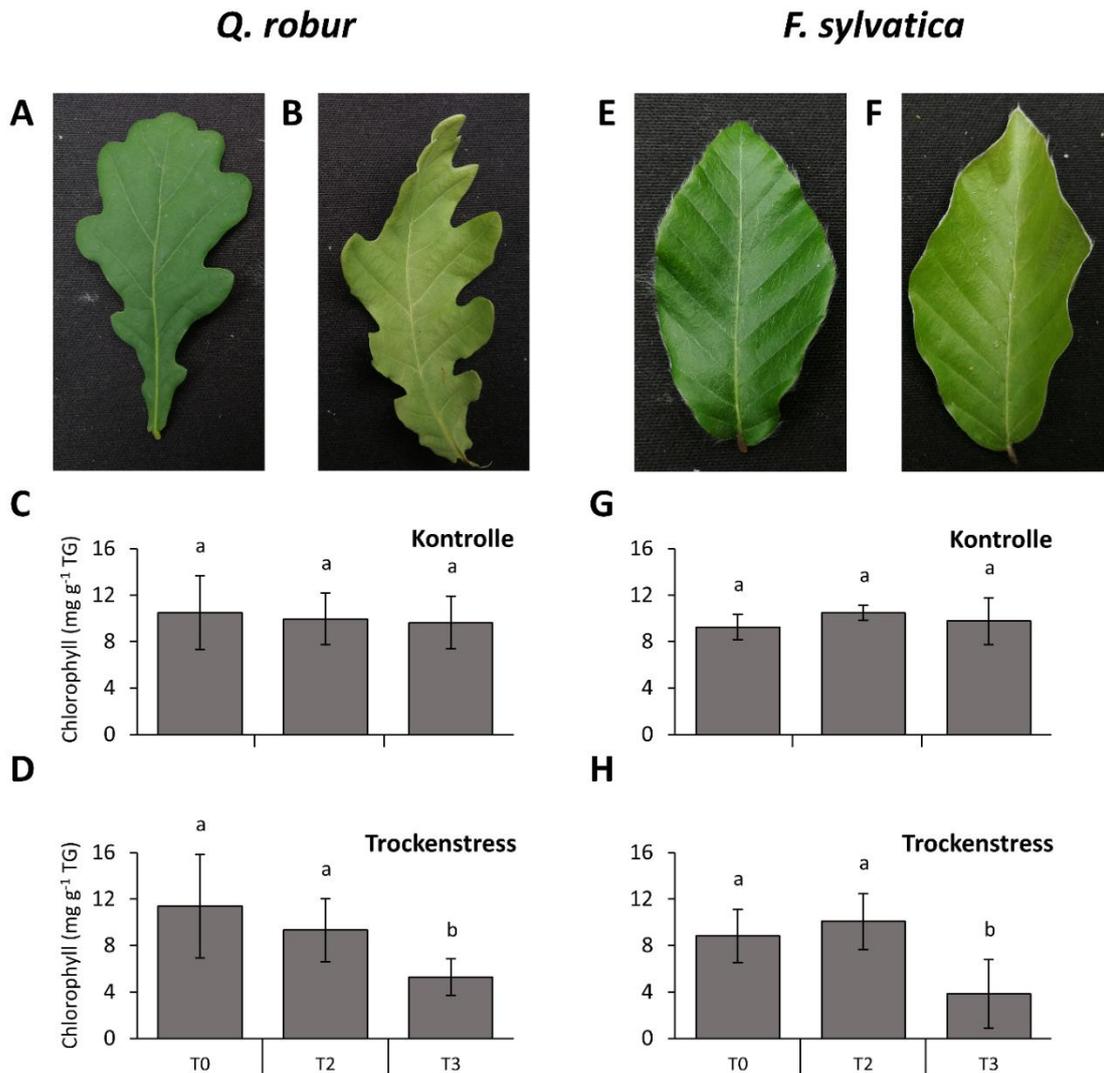
**Abbildung 31: Veränderung der anorganischen Ionen in zwei Vertretern der Pinaceae unter Trockenstress.** Gemessen wurde der Gehalt an Anionen (A, C) und Kationen (B, D) in den Organen Nadeln, Rinde und Holz der Trockenstresspflanzen von *P. sylvestris* (A, B) und *P. abies* (C, D). Unterschiedliche Buchstaben stellen signifikante Unterschiede im Anionen- oder Kationengehalt dar (Tukey's HSD;  $p < 0,05$ ). Mittelwerte  $\pm$  SD,  $n = 6$

Bei *P. abies* konnte in den Nadeln ein konstanter Anionengehalt von etwa 7 mg/g TG gemessen werden, gefolgt von der Rinde mit 6 mg/g TG, im Holz waren es zwischen 1 und 2 mg/g TG (Abbildung 31C). Der Kationengehalt war vergleichbar mit dem Anionengehalt in *P. abies*. In der Nadel waren während des Experiments geringe Schwankungen von 5 bis 7 mg/g TG messbar, in Rinde blieben die Werte mit im Schnitt 7 bzw. im Holz mit 1 mg/g TG konstant (Abbildung 31D).

### 3.8.5 Trockenstress in *Q. robur* und *F. sylvatica*

Neben zwei Nadelbäumen wurden auch zwei Vertreter der Fagaceae untersucht, *Q. robur* und *F. sylvatica*. In Abbildung 32 sind fotografische Aufnahmen vom Laub der beiden untersuchten Arten zum letzten Sammelzeitpunkt, also drei Wochen ohne Wassergabe, dargestellt. Zum Vergleich wurden jeweils ein Blatt einer Kontrollpflanze (Abbildung 32A, E) und ein Blatt einer Trockenstresspflanze (Abbildung 32B, F) fotografiert. Bei *Q. robur* konnten zwischen Kontrollpflanze und Trockenstresspflanze deutliche Unterschiede im Zustand des Laubs festgestellt werden. Während die Kontrollpflanzen deutlich dunkelgrün gefärbt waren (Abbildung 32A), zeigten die Blätter der Trockenstresspflanzen nach drei Wochen deutliche Welkesymptome. Hier waren die Blätter blass gelbgrün und die Blattränder rollten sich in adaxialer Richtung ein (Abbildung 32B). Ergänzend zu den Bildaufnahmen wurde der Chlorophyllgehalt in den Blättern bestimmt. In den Kontrollpflanzen von *Q. robur* wurde ein konstanter Chlorophyllgehalt von etwa 10 mg/g TG während der verschiedenen Sammelzeitpunkte gemessen (Abbildung 32C). Bei den Trockenstresspflanzen konnte eine Abnahme im Chlorophyllgehalt festgestellt werden. Nach 3 Wochen ohne Bewässerung sank der Chlorophyllgehalt auf die Hälfte des Startwertes ab (Abbildung 32D).

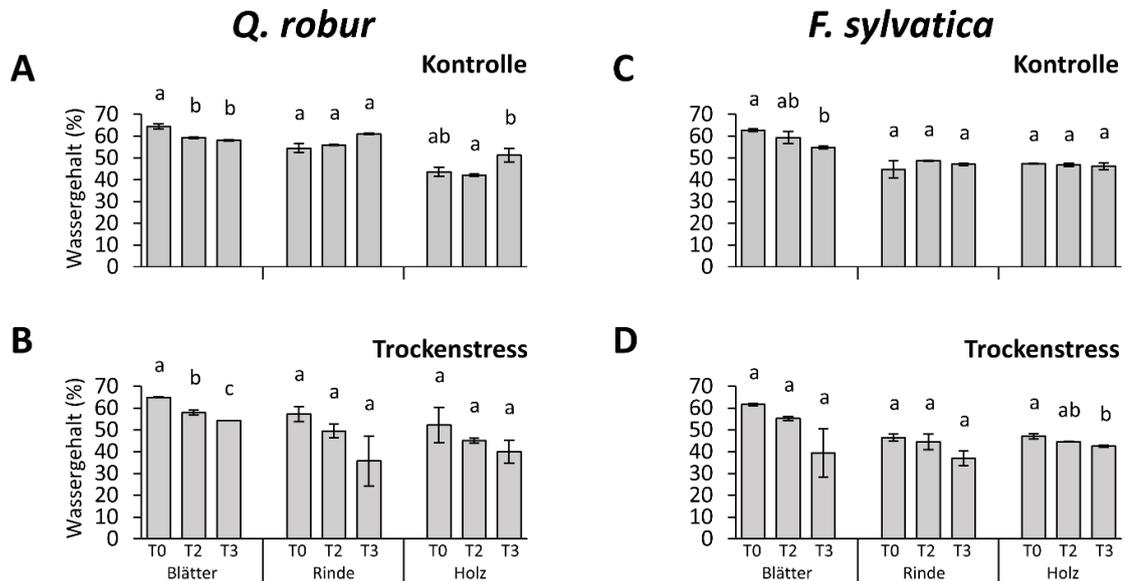
Bei *F. sylvatica* konnte ebenfalls ein Unterschied im Laub von Kontroll- und Trockenstresspflanze festgestellt werden. Während die Blätter der Kontrollpflanze dunkelgrün waren (Abbildung 32E), zeigten die Blätter der Trockenstresspflanzen eine blass gelbgrüne Farbe und auch hier rollten sich die Blattränder in adaxialer Richtung ein (Abbildung 32F). Der Chlorophyllgehalt der Kontrollpflanzen von *F. sylvatica* schwankte nur leicht von 9 bis 10,5 mg/g TG während des Trockenstressexperiments, jedoch unterliegen den Schwankungen keine statistische Signifikanz (Abbildung 32G). Bei den Trockenstresspflanzen konnte nach drei Wochen ohne Bewässerung jedoch eine signifikante Abnahme im Chlorophyllgehalt gemessen werden, sodass im Blattgewebe der Trockenstresspflanzen nur noch ein Chlorophyllgehalt von 4 mg/g TG festgestellt werden konnte (Abbildung 32H).



**Abbildung 32: Veränderungen im Habitus und im Chlorophyllgehalt in zwei Vertretern der Fagaceae unter Trockenstress.** Dargestellt sind Fotos der Blätter von *Q. robur* (A-B) und *F. sylvatica* (E-F) gesammelt von Kontroll- (A, E) und Trockenstresspflanzen (B, F) zum Zeitpunkt T3. Ebenfalls gemessen wurde der Chlorophyllgehalt in den Blättern von Kontroll- (C-D) und Trockenstresspflanzen (G-H). Unterschiedliche Buchstaben stellen signifikante Unterschiede im Chlorophyllgehalt dar (Tukey's HSD;  $p < 0,05$ ). Mittelwerte  $\pm$  SD,  $n = 6$

Als weiterer Parameter wurde der Wassergehalt in den Geweben Blättern, Rinde und Holz untersucht. In den Kontrollpflanzen von *Q. robur* konnte in den Blättern der höchste Wassergehalt gemessen werden, dieser schwankte zwischen 58 und 65 %. In der Rinde wurden 55 bis 60 % Wassergehalt gemessen. Auch im Holz der Kontrollpflanzen von *Q. robur* gab es einige Schwankungen, sodass hier der Wassergehalt zwischen 41 und 50 % lag (Abbildung 33A). In den Trockenstresspflanzen konnte lediglich in den Blättern eine signifikante Abnahme des Wassergehaltes gemessen werden, dieser betrug nach drei Wochen ohne Bewässerung noch 55 %. In der Rinde sank der Wassergehalt nach drei Wochen auf etwa 36 %. Durch die hohe Standardabweichung ist die Abnahme im Wassergehalt der Rinde jedoch nicht statistisch signifikant. Im Holz der

Trockenstresspflanzen konnte zum letzten Sammelzeitpunkt ein Wassergehalt von 40 % gemessen werden. Auch hier sind die Änderungen aufgrund der Standardabweichung nicht statistisch signifikant (Abbildung 33B).



**Abbildung 33: Veränderungen des Wassergehalts in zwei Vertretern der Fagaceae unter Trockenstress.** Gemessen wurde der prozentuale Wassergehalt von *Q. robur* (A-B) und *F. sylvatica* (C-D) in den Organen Blätter, Rinde und Holz in Kontroll- (A, C) und Trockenstresspflanzen (B, D). Unterschiedliche Buchstaben stellen signifikante Unterschiede im Wassergehalt dar (Tukey's HSD;  $p < 0,05$ ). Mittelwerte  $\pm$  SD,  $n = 6$

Auch bei *F. sylvatica* wurde der Wassergehalt in Blättern, Rinde und Holz gemessen. In den Kontrollpflanzen zeigten die Blätter den höchsten Wassergehalt, hier gab es Schwankungen von 55 bis 63 %. In der Rinde und dem Holz war der gemessene Wassergehalt während des Versuchszeitraumes ähnlich hoch. In der Rinde konnten 45 bis 50 % Wassergehalt gemessen werden, im Holz waren es 46 bis 48 % Wassergehalt (Abbildung 33C). Bei den Trockenstresspflanzen konnte in allen Geweben eine Abnahme im Wassergehalt festgestellt werden. In den Blättern von *F. sylvatica* sank der Wassergehalt nach drei Wochen ohne Bewässerung auf 40 % ab, jedoch konnte aufgrund der hohen Standardabweichung keine statistische Signifikanz der Abnahme bewiesen werden. Am letzten Sammelzeitpunkt betrug der Wassergehalt in der Rinde der Trockenstresspflanzen nur noch 38%. Im Holz konnte nach drei Wochen ohne Bewässerung ein Wassergehalt von 42 % gemessen werden (Abbildung 33D).

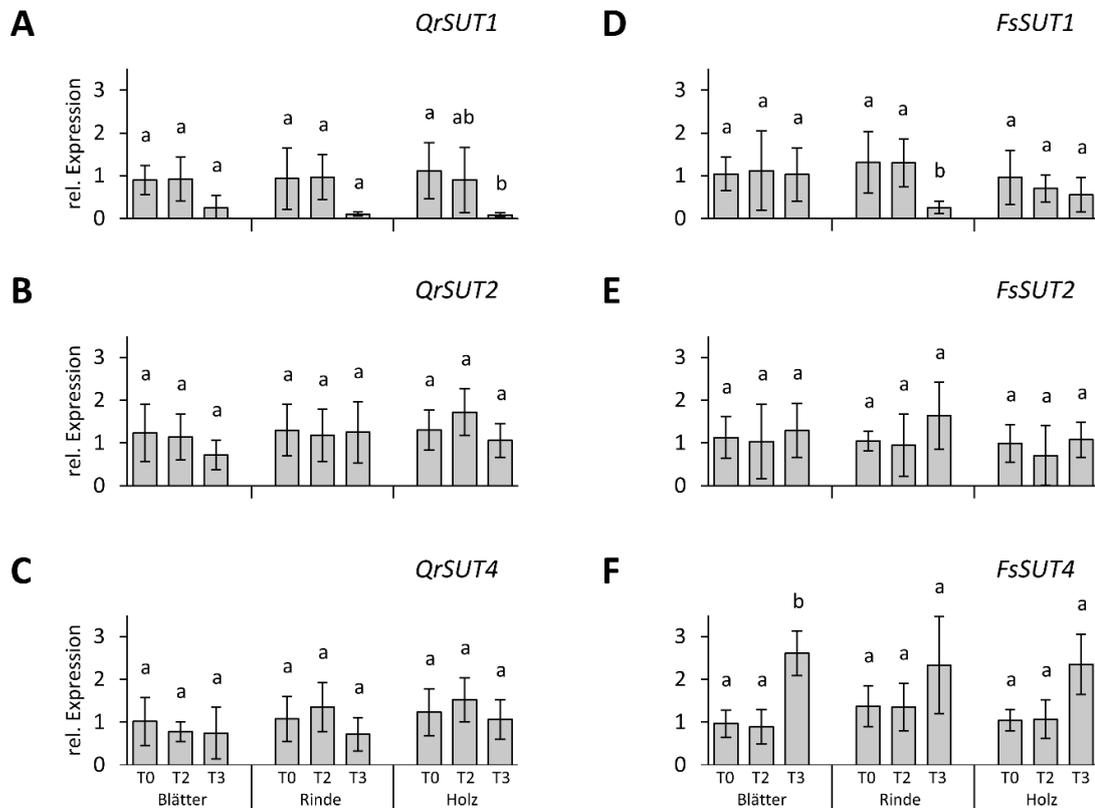
### 3.8.6 Expression von *SUT* in *Q. robur* und *F. sylvatica* unter dem Einfluss von Trockenstress

Auch in den beiden Laubbäumen wurde die Expression der *SUT* im Laufe des Trockenstress-Experiments untersucht. Bei den beiden untersuchten Fagaceae sind jeweils drei *SUT* bekannt, die sich zu den drei verschiedenen Typen zuordnen lassen. *SUT1* gehört zum Typ I, *SUT2* zum Typ II und mit *SUT4* ist hier auch ein *SUT* des Typ III vertreten, weshalb hier die Expression von drei verschiedenen *SUT* untersucht wurde.

Bei *Q. robur* war die Expression von *QrSUT1* in allen Organen nach zwei Wochen ohne Bewässerung immer noch genauso stark wie zu Beginn. Nach drei Wochen jedoch war die relative Expression deutlich gesunken, in den Blättern auf ein Viertel des ersten Expressionsniveaus, in Rinde und Holz betrug sie nur noch ein Zehntel der relativen Expression zum Start des Experiments (Abbildung 34A). Die Expression von *QrSUT2* zeigte sich auf einem stabilen Niveau ohne statistisch signifikante Änderungen. In den Blättern nahm die Expression um etwa ein Drittel ab, wohingegen in der Rinde überhaupt keine Schwankungen erkennbar waren. Im Holz nahm die Expression nach zwei Wochen ohne Bewässerung leicht zu, sank aber nach drei Wochen ohne Wasser wieder auf das Startniveau ab (Abbildung 34B). Der *SUT* des Typ III in *Q. robur*, *QrSUT4*, war während des Trockenstress-Experiments zu jedem Zeitpunkt etwa gleichstark exprimiert, die relative Expression schwankte von 0,7 bis 1,5-fach (Abbildung 34C).

Die Expression von *FsSUT1* in *F. sylvatica* blieb in den Blättern während des Trockenstressversuchs auf einem konstanten Niveau. In der Rinde verhielt sich die Expression von *FsSUT1* ähnlich zu der Expression von *QrSUT1*, hier war die Expression nach zwei Wochen ohne Bewässerung genauso stark wie zu Beginn des Experiments, nach drei Wochen betrug sie nur noch ein Fünftel des Expressionsniveaus zum Versuchsstart. Im Holz ließ sich eine minimale Abnahme der relativen Expression feststellen, sodass sie nach drei Wochen etwa halb so stark war wie zu Beginn der Versuchsreihe (Abbildung 34D). Die Expression von *FsSUT2* zeigte sich ohne signifikante Veränderungen in allen Organen. In der Rinde gab es nach drei Wochen einen leichten Anstieg in der Expressionsstärke, beim Holz konnte man nach zwei Wochen eine leichte Abnahme erkennen, aber auch hier war die Expressionsstärke von *FsSUT2* wieder auf das Startniveau gestiegen (Abbildung 34E). Auch die Expression von *FsSUT4* zeigte sich in allen Organen zu Beginn und nach zwei Wochen ohne Bewässerung auf einem konstanten Niveau. Nach drei Wochen ohne Bewässerung konnte

jedoch in den Organen Blätter, Rinde und Holz ein Anstieg der relativen Expression auf das 2,3 bis 2,5-fache festgestellt werden (34F).



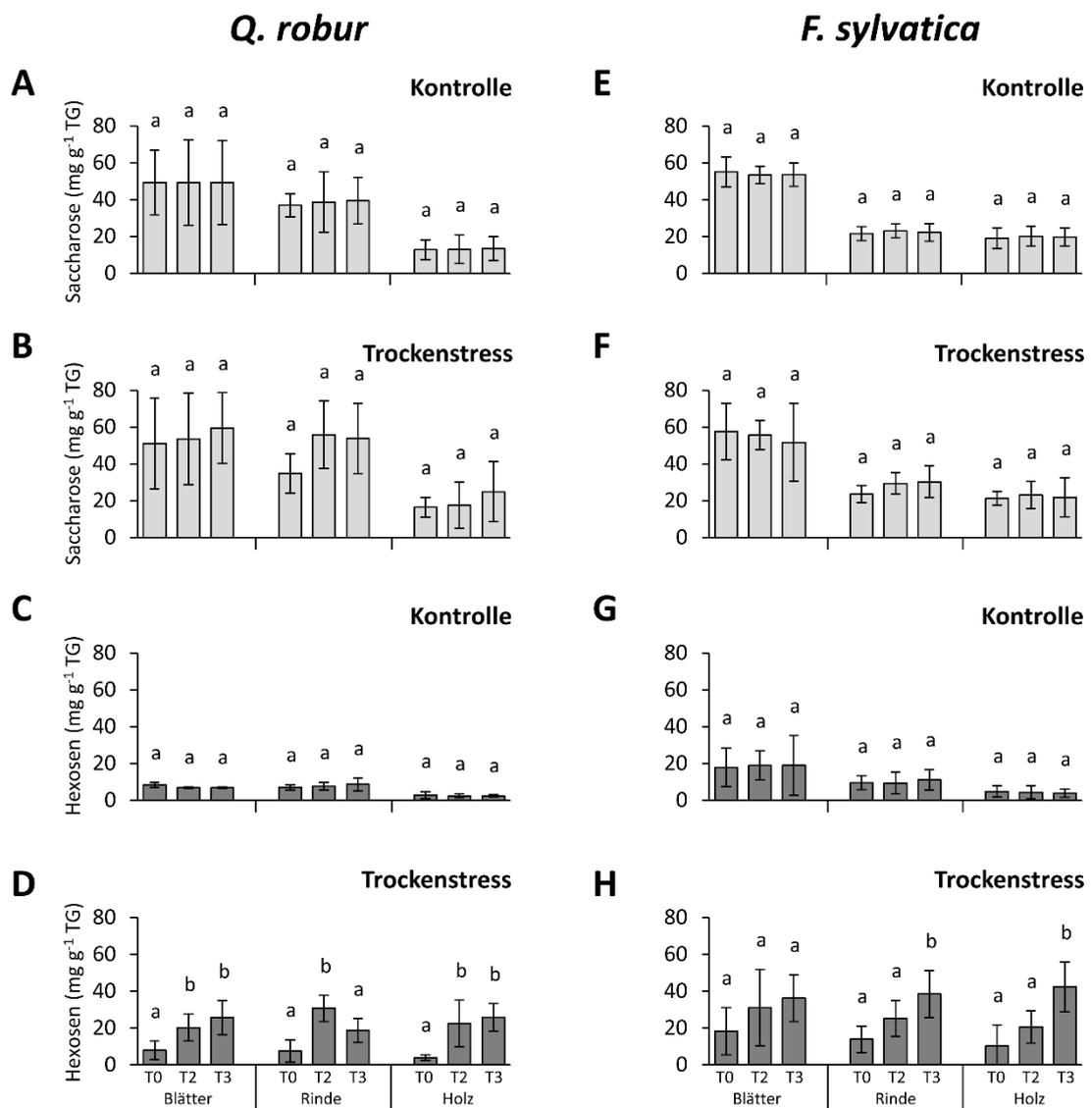
**Abbildung 34: Veränderung der Expression von *SUT* in zwei Vertretern der Fagaceae unter Trockenstress.** Gemessen wurde die relative Expression von *SUT1* (A, D), *SUT2* (B, E) und *SUT4* (C, F) in den Organen Blätter, Rinde und Holz von *Q. robur* (A-C) und *F. sylvatica* (D-F). Unterschiedliche Buchstaben stellen signifikante Unterschiede in den Expressionsniveaus dar (Tukey's HSD;  $p < 0,05$ ). Mittelwerte  $\pm$  SD,  $n = 6$

### 3.8.7 Zucker- und Stärkegehalte in *Q. robur* und *F. sylvatica* unter dem Einfluss von Trockenstress

Neben der Expression der SUT und dem Chlorophyll- und Wassergehalt wurde ebenfalls der Einfluss von Trockenstress auf den Zucker- und Stärkegehalt in den drei untersuchten Geweben von *Q. robur* und *F. sylvatica* untersucht. In den beiden Vertretern der Fagaceae waren die hauptsächlich vorkommenden löslichen Zucker die Monosaccharide Glukose und Fruktose und das Disaccharid Saccharose. In der Auswertung des Zuckergehalts wurden Glukose und Fruktose aufaddiert und sind in den kommenden Diagrammen als Hexosen dargestellt (Abbildung 35C-D, G-H).

Bei den Kontrollpflanzen von *Q. robur* war der Saccharosegehalt während der gesamten Versuchszeit sehr stabil. In den Blättern wurde ein Saccharosegehalt von 50 mg/g TG festgestellt, während die Rinde mit 39 mg/g TG einen etwas geringeren Saccharosegehalt

aufweisen konnte. Das Holz hatte mit 12 mg/g TG den geringsten Saccharosegehalt (Abbildung 35A). Der Saccharosegehalt in den Trockenstresspflanzen war etwa gleich hoch verglichen mit dem Saccharosegehalt der Kontrollpflanzen. Auch in den Messungen des Saccharosegehalts der Trockenstresspflanzen konnten keine statistisch signifikanten Änderungen festgestellt werden (Abbildung 35B).

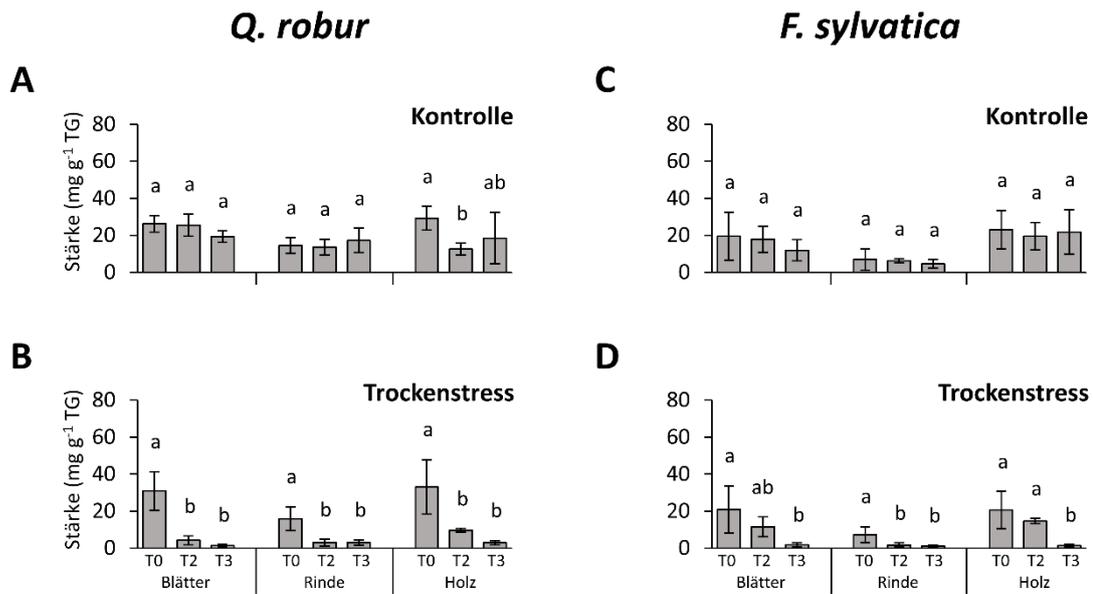


**Abbildung 35: Veränderung des Zuckergehalts in zwei Vertretern der Fagaceae unter Trockenstress.** Gemessen wurde der Gehalt an Saccharose (A-B, E-F) und den Hexosen (C-D, G-H) in den Organen Blätter, Rinde und Holz von *Q. robur* (A-D) und *F. sylvatica* (E-H). Die Hexosen sind jeweils die Summe aus den gemessenen Daten zu den Zuckern Glukose und Fruktose. Dargestellt sind die Diagramme der Trockenstresspflanzen, die während des Versuchszeitraumes nicht gewässert wurden (B, D, F, H) und die dazugehörigen Kontrollpflanzen, die ausreichend mit Wasser versorgt wurden (A, C, E, G). Unterschiedliche Buchstaben stellen signifikante Unterschiede im Saccharose-, Hexose- oder Stärkegehalt dar (Tukey's HSD;  $p < 0,05$ ). Mittelwerte  $\pm$  SD,  $n = 6$

Im Vergleich zur Saccharose wurde ein deutlich geringerer Hexosegehalt bei *Q. robur* festgestellt. So betrug der Hexosegehalt in Blättern und Rinde in den Kontrollpflanzen während des gesamten Versuchszeitraumes lediglich 8 bis 10 mg/g TG. Im Holz konnte ein Hexosegehalt von 4 mg/g TG nachgewiesen werden (Abbildung 35C). Die Messungen der Hexosen im Gewebe der Trockenstresspflanzen zeigte eine deutliche Zunahme im Hexosegehalt in Blättern, Rinde und Holz. In den Blättern stieg der Hexosegehalt nach zwei Wochen ohne Bewässerung auf 20 mg/g TG an und erreichte nach drei Wochen ohne Bewässerung 25 mg/g TG. Beide Werte sind statistisch signifikant höher als der Wert zum Start des Experiments. In der Rinde stieg der Hexosegehalt zwei Wochen nach Versuchsstart auf statistisch signifikante 30 mg/g TG. Nach drei Wochen ohne Wasser sank der Hexosegehalt in der Rinde auf 19 mg/g TG. Im Holz konnten nach zwei Wochen ohne Bewässerung bereits 22 mg Hexosen pro g Trockengewicht gemessen werden. Zum letzten Sammelzeitpunkt hat sich der Hexosegehalt in diesem Gewebe auf 27 mg/g TG erhöht (Abbildung 35D).

Der Saccharosegehalt in den Kontrollpflanzen von *F. sylvatica* war während des Versuchsdauer gleichbleibend. In den Blättern wurde ein Saccharosegehalt von 55 mg/g TG gemessen, in der Rinde betrug dieser nur 22 mg/g TG und im Holz wurde ein Saccharosegehalt von 20 mg/g TG nachgewiesen (Abbildung 35E). Der Saccharosegehalt in den Trockenstresspflanzen war vergleichbar hoch mit dem Saccharosegehalt der Kontrollpflanzen, auch hier konnten keine signifikanten Änderungen festgestellt werden (Abbildung 35F).

Auch in *F. sylvatica* war der Hexosegehalt deutlich geringer als der Saccharosegehalt. In den Kontrollpflanzen blieb der Hexosegehalt gleichbleibend, in den Blättern betrug dieser 19 mg/g TG, in der Rinde konnten 10 mg/g TG an Hexosen nachgewiesen werden. Im Holz betrug der Gehalt an Hexose 5 mg/g TG (Abbildung 35G). In den Trockenstresspflanzen konnte eine Zunahme der Hexosen mit fortschreitender Trockenheit beobachtet werden. Zum letzten Sammelzeitpunkt konnte in den Blättern der Trockenstresspflanzen von *F. sylvatica* ein Hexosegehalt von 35 mg/g TG gemessen werden. Nach drei Wochen ohne Bewässerung stieg der Hexosegehalt in der Rinde der Trockenstresspflanzen auf 38 mg/g TG an. Im Holz konnte zum letzten Sammelzeitpunkt ein Hexosegehalt von 42 mg/g TG gemessen werden (Abbildung 35H).



**Abbildung 36: Veränderung des Stärkegehalts in zwei Vertretern der Fagaceae unter Trockenstress.** Gemessen wurde der Gehalt an Stärke in den Organen Blätter, Rinde und Holz von *Q. robur* (A-B) und *F. sylvatica* (C-D). Dargestellt sind die Diagramme der Trockenstresspflanzen, die während des Versuchszeitraumes nicht gewässert wurden (B, D) und die dazugehörigen Kontrollpflanzen, die ausreichend mit Wasser versorgt wurden (A, C). Unterschiedliche Buchstaben stellen signifikante Unterschiede im Stärkegehalt dar (Tukey's HSD;  $p < 0,05$ ). Mittelwerte  $\pm$  SD,  $n = 6$

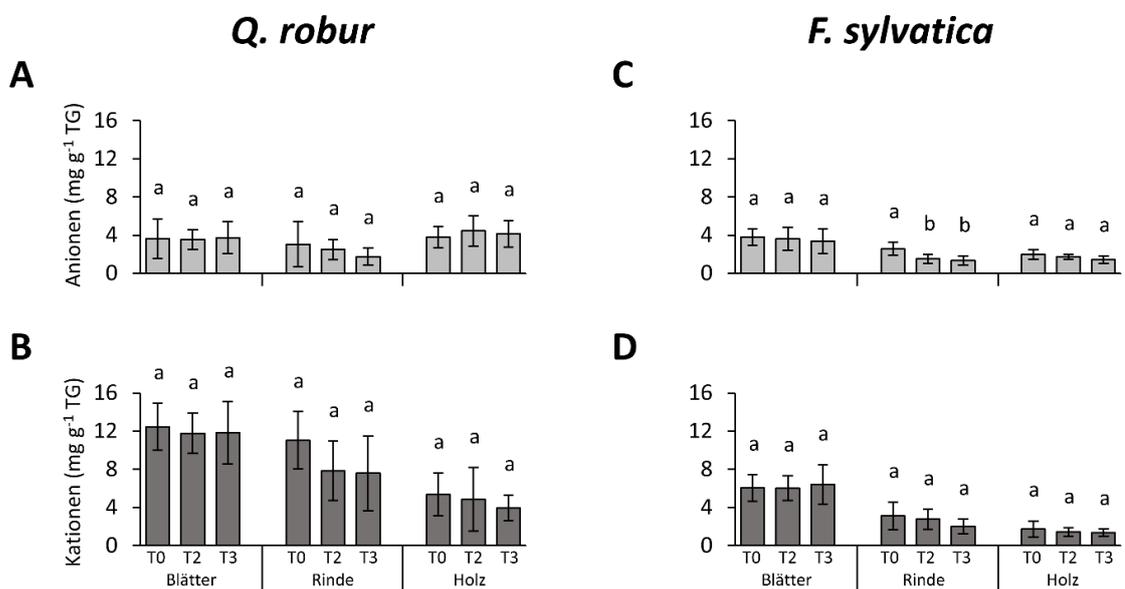
Neben den Zuckern wurde ebenfalls der Stärkegehalt in *Q. robur* und *F. sylvatica* unter dem Einfluss von Trockenstress untersucht. In den Kontrollpflanzen von *Q. robur* blieb der Stärkegehalt mit 20 bis 25 mg/g TG in den Blättern und 13 bis 18 mg/g TG in der Rinde während des Versuchszeitraumes konstant. Wohingegen der Stärkegehalt im Holz vom Startzeitpunkt bis zwei Wochen nach Beginn des Versuches von 30 mg/g TG auf 12 mg/g TG abnahm. Nach drei Wochen zeigte das Gewebe mit 18 mg/g TG wieder einen etwas erhöhten Stärkegehalt (Abbildung 36A). Bei den Trockenstresspflanzen konnte in allen Organen eine deutlich signifikante Abnahme im Stärkegehalt ab der zweiten Woche beobachtet werden. In den Blättern konnte nach bereits zwei Wochen nur noch ein Stärkegehalt von 5 mg/g TG nachgewiesen werden, welcher noch weiter abnahm. In der Rinde wurde nach zwei Wochen ohne Bewässerung ein Stärkegehalt von 3 mg/g TG gemessen werden. Im Holz fiel der Stärkegehalt nach zwei Wochen ohne Bewässerung auf 10 mg/g TG ab. Zum letzten Sammelzeitpunkt konnte in dem Gewebe nur noch 4 mg Stärke pro g Trockengewicht gemessen werden (Abbildung 36B).

In den Kontrollpflanzen von *F. sylvatica* konnten keine signifikanten Änderungen im Stärkegehalt während des Versuchszeitraumes festgestellt werden. In den Blättern wurde ein Stärkegehalt von 12 bis 20 mg/g TG gemessen, im Holz war es mit 20 bis 22 mg/g TG ein etwas höherer Stärkegehalt. Die Rinde wies mit 5 bis 8 mg/g TG den geringsten

Stärkegehalt der untersuchten Gewebe auf (Abbildung 36C). Im Gegensatz zu den Kontrollpflanzen konnte bei den Trockenstresspflanzen eine signifikante Abnahme im Stärkegehalt gemessen werden. In den Blättern und dem Holz der Trockenstresspflanzen lag der Stärkegehalt nach drei Wochen ohne Bewässerung bei 2 mg/g TG. In der Rinde konnte bereits nach zwei Wochen eine signifikante Abnahme auf 2 mg Stärke pro g Trockengewicht gemessen werden, die auch nach drei Wochen Trockenstress konstant niedrig blieb (Abbildung 36D).

### 3.8.8 Anorganische Ionen in *Q. robur* und *F. sylvatica* unter dem Einfluss von Trockenstress

Als letzter Parameter wurde der Einfluss von Trockenstress auf den Gehalt an anorganischen Ionen in *Q. robur* und *F. sylvatica* untersucht. Die Messungen der anorganischen Ionen sind jeweils als Summe der Anionen ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{PO}_4^{2-}$  und  $\text{SO}_4^{2-}$ ) bzw. als Summe der Kationen ( $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ) der Trockenstresspflanzen dargestellt.



**Abbildung 37: Veränderung der anorganischen Ionen in zwei Vertretern der Fagaceae unter Trockenstress.** Gemessen wurde der Gehalt an Anionen (A, C) und Kationen (B, D) in den Organen Blätter, Rinde und Holz von *Q. robur* (A, B) und *F. sylvatica* (C, D). Unterschiedliche Buchstaben stellen signifikante Unterschiede im Anionen- oder Kationengehalt dar (Tukey's HSD;  $p < 0,05$ ). Mittelwerte  $\pm$  SD,  $n = 6$

In *Q. robur* lag der Anionengehalt sowohl in den Blättern als auch im Holz bei ca. 4 mg/g TG, in der Rinde war er mit 2 bis 3 mg/g TG etwas geringer (Abbildung 37A). Im Vergleich zu den Anionen war der Kationengehalt der Trockenstresspflanzen deutlich

höher. In den Blättern konnte mit 12 mg/g TG der höchste Kationengehalt in den untersuchten Organen von *Q. robur* gemessen werden. In der Rinde konnte während der verschiedenen Sammelzeitpunkte ein Kationengehalt zwischen 8 und 11 mg/g TG nachgewiesen werden. Durch die hohen Standardabweichungen waren die Schwankungen jedoch nicht statistisch signifikant unterschiedlich. Der Gehalt an anorganischen Kationen lag im Holz zwischen 4 und 6 mg/g TG (Abbildung 37B). Weder im Anionen- noch im Kationengehalt konnten signifikante Änderungen festgestellt werden.

Bei *F. sylvatica* wurde in den Blättern mit 4 mg/g TG der höchste Anionengehalt in den untersuchten Geweben gemessen, Schwankungen im Anionengehalt waren bei den Blättern während des Experiments nicht feststellbar. In der Rinde der Trockenstresspflanzen wurde zu Beginn des Versuchs ein Anionengehalt von 3 mg/g TG gemessen, welcher nach zwei Wochen ohne Bewässerung auf unter 2 mg/g TG abnahm und diesen Wert auch nach 3 Wochen nicht unterschritt. Der Verlust an anorganischen Anionen in der Rinde war statistisch signifikant. Genau wie in den Blättern konnte im Holz ein gleichbleibender Gehalt an Anionen festgestellt werden, der Anionengehalt lag in diesem Gewebe bei ca. 2 mg/g TG (Abbildung 37C). Im Kationengehalt konnte bei keinem Gewebe der beprobten Trockenstresspflanzen eine Änderung festgestellt werden. In den Blättern belief sich der Gehalt an anorganischen Kationen bei 6 mg/g TG, in der Rinde wurden zwischen 2 und 3 mg mg/g TG gemessen und der Kationengehalt im Holz lag zwischen 1 und 2 mg/g TG (Abbildung 37D).

## 4. Diskussion

### 4.1 Identifikation von zwei Saccharosetransportern in *P. sylvestris*

Da nicht alle Organe in Pflanzen eine photosynthetische Aktivität aufweisen, ist der Transport von Photoassimilaten von den Orten der Produktion zu den Orten des Verbrauchs ein zentraler Aspekt in der Versorgung mit Kohlenhydraten. Wichtig hierfür ist der Mechanismus der Phloembeladung, der passiv symplastisch oder aktiv über den Apoplasten erfolgen kann. Für die aktive Phloembeladung sind Saccharosetransporter notwendig.

Funktionale SUT wurden sowohl in krautigen als auch schon in zahlreichen holzigen Angiospermen nachgewiesen. In Gymnospermen wurden durch Dobbstein *et al.* (2018) die ersten SUT-Sequenzen im Transkriptom von *P. abies* und *G. biloba* identifiziert. Erste Lokalisationsergebnisse und Funktionscharakterisierungen zu den Koniferen-SUT aus *C. deodara* und *P. massoniana* wurden erst kürzlich von Han *et al.* (2022) publiziert.

Im Zuge dieser Arbeit konnten zwei weitere SUT einer Konifere identifiziert werden. Mithilfe von degenerierten Primern und den bereits bekannten Primern von *P. abies*, welcher ebenfalls zu der Familie der Pinaceae gehört, konnten sowohl *SUT1* als auch *SUT2* im Transkriptom von *P. sylvestris* gefunden werden. Topologievorhersagen mit den Aminosäuresequenzen der beiden SUT hat ergeben, dass beide Proteine 12  $\alpha$ -helikale membranspannende Domänen aufweisen (Abbildung 16 und 17), was das typische Merkmal für alle bisher identifizierten SUT darstellt (Ward *et al.*, 1998; Williams *et al.*, 2000; Lemoine, 2000). Sequenzalignments mit publizierten Saccharosetransporter-Sequenzen aus Bäumen bestätigten ebenfalls eine deutliche Ähnlichkeit zu den hier identifizierten Sequenzen aus *P. sylvestris* (Tabelle 27). Phylogenetische Analysen ordneten PsySUT1 dem Typ I zu, mit einem geringen evolutionären Abstand zu weiteren SUT1 aus Gymnospermen (Dobbstein *et al.*, 2018; Han *et al.*, 2022). Han *et al.* (2022) wählten für die SUT1 aus *C. deodara* und *P. massoniana* die Bezeichnung Typ I G, da die SUT der Gymnospermen im Stammbaum zwischen Typ I und Typ III der Angiospermen ein eigenes Subcluster bilden. Zudem ist die Ähnlichkeit der beiden Gymnospermen SUT zu AtSUC2, einem SUT des Typ I, nur geringfügig höher als die Ähnlichkeit zu AtSUC4, einem Typ III SUT (Han *et al.*, 2022). Bei dem Vergleich von PsySUT1 mit QrSUT1 und QrSUT4 fällt auf, dass die Ähnlichkeit zu QrSUT4 mit 72,5 % sogar höher ist als die Ähnlichkeit zu QrSUT1 mit 72,1 %, sodass sich ein

ähnlicher evolutionärer Abstand zwischen den beiden SUT aus der Angiosperme *Q. robur* verglichen mit dem SUT1 aus *P. sylvestris* ergibt, was die Hypothese des eigenen Subclusters für die Gymnospermen SUT1 zwischen den SUT Typ I und SUT Typ III unterstützt (Tabelle 27). Betrachtet man die Identität der Aminosäuren jedoch, dann hat QrSUT1 mit 55,9 % mehr identische Aminosäuren mit dem SUT1 aus *P. sylvestris* verglichen mit QrSUT4 mit nur 52,7 %, sodass die Einteilung von PsySUT1 zu den SUT des Typ I nachvollziehbar ist. Mit fortschreitender Entschlüsselung weiterer Gymnospermen-Genome (Nystedt *et al.*, 2013; Stival Sena *et al.*, 2014; Niu *et al.*, 2022) werden voraussichtlich weitere SUT identifiziert, die neue Erkenntnisse zur phylogenetischen Einordnung bereits bekannter SUT-Sequenzen liefern werden.

Mit SUT2 wurde ein Typ II SUT im Transkriptom von *P. sylvestris* identifiziert. Mit 605 Aminosäuren ist PsySUT2 deutlich länger als PsySUT1 mit nur 516 Aminosäuren, dabei sind die N-terminale Region und der cytoplasmatisch gelegene *loop* bei PsySUT2 länger als dieselben Bereiche in PsySUT1 (Abbildung 16 und 17). Die phylogenetische Analyse ordnet PsySUT2 bei den SUT des Typ II ein, mit einer nahen Verwandtschaft zu den SUT des Typ II, die bisher in Gymnospermen gefunden wurden (Abbildung 18). Charakteristisch für den Typ II Transporter ist die Länge des Proteins, die sowohl bei den Angiospermen als auch bei den Gymnospermen deutlich länger ist, verglichen mit SUT der anderen beiden Typen (Reinders *et al.*, 2012; Dobbstein *et al.*, 2018). Neben der Identifizierung von SUT des Typ II, sowohl in Gymnospermen als auch in mono- und dikotylen Angiospermen, konnten auch Sequenzen des Typ II aus dem nicht-vaskulären Laubmoos *Physcomitrella patens* und dem vaskulären, aber nicht samenbildenden Moosfarn *Selaginella moellendorffii* isoliert werden. Das Vorhandensein von SUT dieses Typs in bereits sehr ursprünglichen Landpflanzen wie dem Laubmoos ließ Reinders *et al.* (2012) vermuten, dass die Variante des Transporters ursprünglich sein muss.

Die beiden identifizierten SUT aus *P. sylvestris* sind sowohl in allen vegetativen als auch in allen generativen, oberirdischen Organen exprimiert. *PsySUT1* zeigt eine stärkere relative Expression in jungen Nadeln und in männlichen Zapfen (Abbildung 20A). Hierbei handelt es sich um *sink*-Gewebe, welches auf die Versorgung durch das Phloem mit Saccharose angewiesen ist. *PsySUT2* hingegen zeigt eine konstante relative Expression in allen untersuchten oberirdischen Pflanzenorganen (Abbildung 20B). Beim Vergleich der Expressionsstärke der beiden SUT fällt auf, dass *PsySUT2* deutlich stärker in allen Geweben exprimiert ist verglichen mit *PsySUT1* (Abbildung 19).

Ein SUT des Typ III konnte in *P. sylvestris* auch durch zahlreiche cDNA-*screenings* nicht gefunden werden. Die Suche nach SUT dieses Typs gestaltete sich auch in bereits publizierten Genomdatenbanken von weiteren Koniferen als nicht erfolgreich, sodass in den Genomen von *Pinus taeda* (Zimin *et al.*, 2014), *Picea glauca* (Stival Sena *et al.*, 2014), *Pinus lambertiana* (Crepeau *et al.*, 2017), *Abies alba* (Mosca *et al.*, 2019) und *Pinus tabuliformis* (Niu *et al.*, 2022) keinen Hinweis auf einen SUT des Typ III zu finden war. Auch Han *et al.* (2022) fanden im Transkriptom der beiden Koniferen *Cedrus deodara* und *Pinus massoniana* lediglich SUT des Typ I und des Typ II. Ein SUT des Typ III wurde in Gymnospermen bisher mit GbSUT4 nur im Transkriptom von *Ginkgo biloba* nachgewiesen (Dobbelstein *et al.*, 2018).

#### **4.2 Funktionscharakterisierung von SUT aus Gymnospermen – Ein Problem des *targeting*?**

Damit eine Aussage über die Transportfähigkeit der beiden neu identifizierten putativen SUT aus *P. sylvestris* getroffen werden konnte, wurde die Aufnahme von Saccharose durch heterologe Expression in Hefe in Zusammenarbeit mit Dr. Franz Klebl (AG Molekulare Pflanzenphysiologie, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg) durchgeführt. Dabei konnte nach mehreren Versuchen keine Saccharoseaufnahme verzeichnet werden. Ursachen für die nicht erfolgte Aufnahme sind vielfältig, einerseits könnte Saccharose das falsche Substrat sein, da SUT neben Saccharose noch weitere Substrate, wie verschiedene Zucker und Glucoside transportieren können und die Affinität der weiteren Substrate größer sein kann als die Substrataffinität von Saccharose (Reinders *et al.*, 2012). Andererseits kann die evolutionäre Distanz zwischen Hefe und *P. sylvestris* zu groß sein, sodass der Transporter an die falsche Membran gelangt oder für die korrekte Funktion wichtige Proteinmodifikationen fehlen. Die falsche Lokalisation von heterolog exprimierten Transportern in Hefe wurde bereits beim SUT Typ III aus einigen krautigen Pflanzen beobachtet (Barker *et al.*, 2000; Schneider *et al.*, 2012). Expressionsanalysen in Hefe, die mit einem Fusionsprotein aus PaSUT1 und dem Fluorophor GFP von Dr. Klebl durchgeführt wurden, zeigten ein deutliches GFP-Signal, das jedoch nicht an der Plasmamembran, sondern an intrazellulären Organellen zu finden war, weshalb es hier nicht zu einer Aufnahme kommen konnte (pers. Mitteilung). Durch eine hohe Übereinstimmung in den Aminosäuresequenzen von den SUT aus *P. abies* und *P. sylvestris* kann davon ausgegangen werden, dass PsySUT1 in Hefen vermutlich ähnlich lokalisiert und deshalb auch keine Aufnahme von Saccharose gemessen werden

konnte. Durch die fehlerhafte Lokalisation kann also nicht auf die Funktionalität geschlossen werden. Eine nicht erfolgreiche Saccharoseaufnahme durch den Transporter AtSUC7 wurde bereits von Sauer *et al.* (2004) beobachtet, woraufhin postuliert wurde, dass es sich bei diesem *SUT* um ein nicht-funktionales Pseudogen handeln muss. Auch aktuelle Studien zeigen, dass eine Funktionscharakterisierung von den Gymnospermen *SUT* aus *P. massioniana* und *C. deodara* in Hefen nicht erfolgreich war, da die transformierten Hefen nur über ein schwaches Wachstum verfügt haben (Han *et al.*, 2022). Es stellte sich also heraus, dass Hefen für die Funktionsüberprüfung in Gymnospermen nur bedingt geeignet sind.

Rottmann *et al.* (2018) entwickelten eine neue Methode zur Funktionscharakterisierung in Mesophyll-Protoplasten. Hier wurde für die Aufnahmefähigkeit das fluoreszierende Saccharose-Analogon Esculin verwendet, welches von *SUT* transportiert werden kann. Die Aufnahme von Esculin durch *SUT* wurde bereits in Hefen demonstriert (Gora *et al.*, 2012), jedoch scheint die Expression von Pflanzenproteinen *in planta* zu einer verlässlicheren Lokalisation zu führen. Aus diesem Grund wurden die ORF der beiden *SUT* aus *P. sylvestris* in Expressionsvektoren kloniert, die nach der Transformation in Mesophyll-Protoplasten aus *A. thaliana* ein Fusionsprotein hervorbrachten, das aus einem der beiden *SUT* bestand, die entweder N- oder C-terminal mit dem Fluorophor GFP markiert waren. Die Markierung an jeweils einem Ende diente dazu, mögliche Interferenzen durch sterische Hinderungen bedingt durch das Fluorophor zu erkennen. So könnte die Faltung des Fusions-Proteins anders sein oder es wird ein internes Lokalisationssignal nicht erkannt, sodass es zur falschen Lokalisation kommt. Bei mehrmaliger Durchführung des Experiments hat keine der Mesophyllzellen, die mit einem der Expressionsvektoren transformiert war, ein GFP-Signal gezeigt. Da die Zellen, die mit den Plasmiden transformiert wurden, die freies GFP exprimieren, ein Fluoreszenzsignal emittiert haben, scheint die Transformation erfolgreich gewesen zu sein. Somit ist die Expression oder die Faltung des Fusions-Proteins ein Problem. Einen Lesefehler durch eine Verschiebung des *open reading frame* konnte durch das wiederholte Sequenzieren des Plasmids ausgeschlossen werden. Neben Protoplasten ist die transiente Expression auch in Epidermiszellen von *Nicotiana tabacum* möglich. Erst kürzlich wurde die heterologe Expression von *SUT* aus *P. massioniana* und *C. deodara* in Epidermiszellen von *N. tabacum* durchgeführt (Han *et al.*, 2022). Anstatt GFP wurde das Fluorophor mCherry verwendet, welches C-terminal an die *SUT* fusioniert wurde. Die erfolgte Aufnahme von Esculin in Epidermiszellen, die die Fusions-Proteine

exprimieren, ist ein Hinweis darauf, dass die getesteten SUT funktionale Transporter sind. Die transiente Expression in *N. tabacum* mit anschließender Aufnahme von Esculin könnte also vor allem für SUT aus Gymnospermen eine verlässliche Methode zur Funktionscharakterisierung sein und sollte mit den SUT aus *P. sylvestris* durchgeführt werden.

### **4.3 PsySUT1 – Ein Typ I SUT mit Lokalisation an der Vakuolenmembran?**

Die subzelluläre Lokalisation von SUT aus *P. sylvestris* in Mesophyll-Protoplasten war auch nach mehreren Versuchen nicht erfolgreich, jedoch konnte durch die Arbeitsgruppe von Dr. Klebl (Friedrich-Alexander-Universität, Erlangen) die Lokalisation eines Fusions-Proteins aus GFP und PaSUT1 in *A. thaliana* Mesophyll-Protoplasten festgestellt werden. Das Fusions-Protein zeigte ein deutliches Signal am Tonoplasten, es scheint also an der Vakuole zu liegen (pers. Mitteilung). Das Ergebnis der Lokalisation entspringt eines einmaligen Versuches und muss mit weiteren Messungen verifiziert werden, da für vakuolär lokalisierende SUT am Beispiel von der Kartoffel *Solanum tuberosum* gezeigt werden konnte, dass eine Doppellokalisierung sowohl in der Vakuole als auch in der Plasmamembran möglich ist (Chincinska *et al.*, 2013). Durch eine zu über 90 % übereinstimmende Aminosäuresequenz der SUT1 von *P. abies* und *P. sylvestris* kann ein ähnliches Ergebnis in der Lokalisation von PsySUT1 erwartet werden, was jedoch ebenfalls experimentell bestätigt werden muss. Die Lokalisation von PsySUT1 in der Vakuole wäre für einen SUT des Typ I ungewöhnlich und eher dem SUT des Typ III zuzuordnen, weshalb hier die These von Han *et al.* (2022) bestätigt werden würde, dass die Gymnospermen SUT des Typ I ihr eigenes Subcluster im Stammbaum bilden und möglicherweise in ihrer Funktion und Lokalisation abweichend von den Angiospermen SUT des Typ I sind.

Durch eine unterschiedliche Lokalisation von N- und C-terminal markiertem PaSUT1 in Mesophyll-Protoplasten kann vermutet werden, dass es innerhalb des Moleküls ein Lokalisationssignal geben muss. Für die Translokation von Membranproteinen in den Tonoplasten wurde für den Monosaccharid-Transporter ESL1 aus *A. thaliana* ein Di-Leucin-Motiv (LXXXLL) in der N-terminalen cytoplasmatischen Region gefunden (Yamada *et al.*, 2010). Auch bei Peptid-, Glukose- und Inosit-Transportern konnte ein Di-Leucin in der N- oder C-terminalen Proteinsequenz gefunden werden, das für die

Lokalisation in der Vakuolenmembran verantwortlich ist (Komarova *et al.*, 2012). Nach Sequenzvergleichen bekannter SUT ist aufgefallen, dass bei SUT des Typ III in krautigen Angiospermen in der N-terminalen Domäne ebenfalls ein Di-Leucin-Motiv (LXXLL) zu finden ist (Reinders *et al.*, 2012). Vergleicht man nun SUT-Sequenzen aus Angiospermen und Gymnospermen, so fällt auf, dass die SUT des Typ III aus holzigen Angiospermen ebenfalls ein vollständiges LXXLL-Motiv aufweisen, während GbSUT4 und die beiden SUT des Typ III aus *Selaginella* und *Physcomitrella* nur unvollständige Di-Leucin-Motive enthalten. Ein unvollständiges Motiv kann mit den Aminosäuren LRTL A ebenfalls bei den SUT des Typ I der Koniferen *Picea* und *Pinus* gefunden werden (Tabelle 28). Da der SUT des Typ I aus denen des Typ III hervorgegangen ist, ist hier eine Mutation des *targeting*-Signals denkbar (Peng *et al.*, 2014). Da AtSUT4, ein SUT des Typ III aus *A. thaliana*, trotz unvollständigem Di-Leucin-Motiv nachweislich an der Vakuolenmembran lokalisiert (Endler *et al.*, 2006), scheint ein vollständiges Lokalisationssignal nicht zwingend notwendig für das *targeting* am Tonoplasten zu sein. Mit der Sequenz KRVL L fehlt bei AtSUT4 im Gegensatz zu den SUT1 aus *Picea* und *Pinus* nicht das letzte, sondern das erste Leucin der *targeting*-Sequenz.

**Tabelle 28: Darstellung der putativen Di-Leucin-Sequenz als vakuoläre *targeting*-Sequenz im N-Terminus von SUT des Typ III**

Typ	Name	Sequenz
<b>I</b>	GbSUT1	15 VPLRTVARVASVATGVCF 31
	PaSUT1	15 VPLRTLARVASVAAGVQF 31
	PsySUT1	15 VPLRTLARITSVAAGVQF 31
	QrSUT1	13 SPVRNIFLVSSIAAGVQF 29
<b>II</b>	GbSUT2	52 SLKTLILSCMIAAGVQFG 69
	PaSUT2	54 SLKTLILSCMIAAGVQFG 71
	PsySUT2	53 SLQTLILSCMIAAGVQFG 70
	QrSUT2	67 CSLATLVLSCTIAAGVQF 84
<b>III</b>	AtSUT4	38 VSKRVLLRVASVACSGIQ 55
	FsSUT4	30 VPLRQLLRVASVACGIQF 43
	GbSUT4	35 VPLRSLFRVASVACGVQF 52
	QrSUT4	36 IPLRLLRVASVACGIQF 49
	PpSUT4	12 VPIRALIQVASVAAGVQF 29
	PtaSUT4	32 VPLRQLLRVTSIAGGIQF 49
	SmSUT4	15 VPLRSLARVACVAAGVQF 32

Für die Identifikation des notwendigen Motivs sind weitere Lokalisationsexperimente mit PsySUT1 und weiteren SUT aus Koniferen notwendig. Auch eine Lokalisation von SUT aus den ursprünglichen Pflanzen *Physcomitrella* und *Selaginella* würden dazu beitragen, die Sequenz zu identifizieren, die für das Tonoplasten-*targeting* notwendig ist.

## 4.4 Zellspezifische Expression von *PsySUT1* und *PsySUT2*

### 4.4.1 Mögliche Beteiligung von *PsySUT1* und *PsySUT2* an der Phloembeladung in den Nadeln

Die Expression der in dieser Arbeit gefundenen *SUT* in *P. sylvestris* konnten durch qPCR sowohl in vegetativen als auch in generativen Organen nachgewiesen werden. Mithilfe der mRNA *in-situ*-Hybridisierung war es möglich die Expression von ausgesuchten Genen in einzelnen Zellen zu visualisieren. Sowohl *PsySUT1* als auch *PsySUT2* zeigten in *source*- als auch im *sink*-Gewebe eine deutliche Färbung, dies bedeutet, dass in den entsprechend angefärbten Zellen *SUT* exprimiert werden. In der *source*-Nadel zeigten sowohl *PsySUT1* als auch *PsySUT2* Expression in den Strasburgerzellen (Abbildung 21A, C). Die Strasburgerzellen gehören zum Phloem und verbinden die Siebzellen mit dem Transfusionsparenchym, sie sind damit also Zellen, die mit dem *pre-phloem pathway* assoziiert sind. Die Assimilate werden in den Mesophyllzellen synthetisiert und gelangen über die Bündelscheide zum Transfusionsparenchym. Vom Transfusionsparenchym werden die Photoassimilate über die Strasburgerzellen in die Siebzellen des Phloems transportiert. Strasburgerzellen sind parenchymatische Zellen des Phloems, sie übernehmen in Gymnospermen die Rolle der Geleitzellen aus Angiospermen. In den Strasburgerzellen findet also die Phloembeladung statt, da sie Verbindungen zu den Siebzellen besitzen. Eine Expression von *SUT* in den Strasburgerzellen deutet also auf eine aktive Beteiligung an der Beladung des Phloems hin. Auch Han *et al.* (2022) beobachteten in den Strasburgerzellen die Lokalisation von *CdSUT1G* und *CdSUT2* und schlossen deshalb auf eine mögliche Beteiligung in der Phloembeladung. In der krautigen Angiosperme *A. thaliana*, die einen aktiven Beladungsmechanismus verwendet, wurde *AtSUC3*, ein *SUT* des Typ II, in den Zellen lokalisiert, die neben dem Phloem liegen, woraufhin postuliert wurde, dass *AtSUC3* dafür zuständig ist, die Saccharose gezielt aus dem Mesophyll ins Phloem zu leiten (Meyer *et al.*, 2000). Es ist also sehr wahrscheinlich, dass die *SUT* aus Koniferen eine ähnliche Funktion haben könnten und Saccharose aus den am Rand gelegenen Strasburgerzellen in die Siebzellen abzugeben. Im Kontrast dazu steht die Expression bei der Pappel *P. tremula x alba*, die den passiven Beladungsmechanismus verwendet. Hier wurde die Lokalisation der Expression der *SUT* des Typ II und des Typ III in *source*-Blättern sowohl gleichmäßig im Mesophyll als auch im Phloem festgestellt (Payyavula *et al.*, 2011) und nicht in einzelnen Phloemzellen, so wie bei *P. sylvestris*. Für die passive Beladung könnte also eine ubiquitäre Expression der

*SUT* in *source*-Blättern notwendig sein. Das Fehlen der ubiquitären Expression der *SUT* in *source*-Nadeln von *P. sylvestris* könnte also ein weiterer Hinweis auf die Verwendung eines aktiven Phloembeladungsmechanismus sein.

#### **4.4.2 *PsySUT1* und *PsySUT2* könnten im Transportphloem bei der Rückgewinnung von Saccharose helfen**

Neben der zellspezifischen Expression im *source*-Gewebe konnte Transkript von *PsySUT1* und *PsySUT2* auch im Phloem von jungen Sprossachsen nachgewiesen werden. *PsySUT2* zeigt eine gleichmäßige Expression in den Phloemzellen, während die Expression von *PsySUT1* sich auf die über dem Phloem liegenden Phloemfasern beschränkte (Abbildung 23A, C). Phloemfasern sind anhand ihrer dickeren Zellwand, die durch sekundäre Zellwandauflagerungen entstehen, gut von Parenchymzellen unterscheidbar und verleihen der Pflanze zusätzlichen mechanischen Halt (Gorshkova *et al.*, 2012), sie sind somit also nicht an der Weiterleitung von Assimilaten beteiligt. Dennoch wurde schon Stärke in Phloemfasern von krautigen Pflanzen nachgewiesen, weshalb diese Zellen auch zur Versorgung mit Kohlenhydraten beitragen (Ageeva *et al.*, 2005; Snegireva *et al.*, 2010). Die Expression von *SUT* in diesen Zellen deutet darauf hin, dass Saccharose gezielt transportiert wird, um dann in Form von Stärke in den Phloemfasern gespeichert zu werden. Da hier jedoch sehr junge Sprossachsen eingebettet wurden, könnte die Expression von *SUT* auch auf eine Versorgung von noch nicht vollständig ausdifferenzierten Zellen hindeuten. Die Lokalisation des Transkripts von *PsySUT2* im Phloem hingegen deutet auf eine Beteiligung an der Phloembeladung hin. Denkbar ist hier vor allem die Rückgewinnung von ausgetretener Saccharose entlang des Phloemtransportweges (van Bel, 2003b; Srivastava *et al.*, 2008). *SUT* des Typ II wurden auch in *P. tremula x alba* im Phloem und den Phloemfasern lokalisiert, auf die Funktion wurden jedoch keine Rückschlüsse gezogen (Payyavula *et al.*, 2011). Neben der Be- und Entladung von Saccharose wurde für *SUT* des Typ II, aufgrund des längeren cytoplasmatisch gelegenen *loops*, ebenfalls eine *sensing*-Funktion angenommen, die im Transportphloem von Bedeutung sein könnte. Diese Hypothese konnte jedoch bisher nicht belegt werden (Meyer *et al.*, 2000; Barker *et al.*, 2000; Kühn, 2003; Braun und Slewinski, 2009).

#### 4.4.3 Eine mögliche Beteiligung von *PsySUT1* und *PsySUT2* an der Versorgung von *sink*-Geweben

SUT wurden bisher nicht nur mit der Phloembeladung assoziiert, sondern auch mit dem Saccharose-Import in *sink*-Geweben, wie zum Beispiel Früchten, in Verbindung gebracht (Gould *et al.*, 2012; Liesche *et al.*, 2015). Hier ist es vor allem der SUT des Typ II, für den eine Beteiligung bei der Entladung des Phloems und des Imports von Assimilaten in Organe, die keine Photosynthese betreiben können, vorgeschlagen wurde (Kühn und Grof, 2010). In dieser Arbeit konnte die Expression von *PsySUT1* und *PsySUT2* in verschiedenen *sinks* nachgewiesen werden. Neben der ubiquitären Expression in *sink*-Nadeln mit noch nicht ausdifferenziertem Gewebe (Abbildung 22), konnte Transkript beider *SUT* sowohl in männlichen als auch in weiblichen Organen nachgewiesen werden (Abbildung 24 und 25). In den jungen *sink*-Nadeln zeigt sich *PsySUT1* mit einer deutlich schwächeren Färbung als die Präparate, die mit der Sonde für *PsySUT2* inkubiert worden sind, dabei sind die Zellen, in denen Expression beider Transkripte festgestellt werden konnte, identisch (Abbildung 22A, C). Da es sich hierbei um Gewebe handelt, welches noch nicht ausdifferenziert ist, könnten die SUT hier für den Import von Saccharose zur Kohlenstoffversorgung des Gewebes wichtig sein. In Querschnitten von weiblichen Zapfen zeigte sich eine Expression von *PsySUT1* und *PsySUT2* in vergleichbarer Stärke in der Samenanlage. Hier sind vor allem die Zellen angefärbt, die dem Integument zugewandt sind und durch einen extrazellulären Raum vom Symplast an dieser Stelle vom Integument getrennt sind (Abbildung 24A, C). Denkbar ist hier also eine zusätzliche Versorgung auf dem apoplastischen Weg zur Kohlenstoffversorgung der zu bildenden Samen. Die Expression von *SUT* des Typ I in Samenanlagen wurde auch schon in Gerste, Weizen und Reis nachgewiesen (Weschke *et al.*, 2000; Bagnall *et al.*, 2000; Furbank *et al.*, 2001). Aber auch bei der Walnuss, die zu den holzigen Angiospermen zählt, wurde die Expression von *SUT1* in vielen *sink*-Organen gemessen, darunter auch in den weiblichen Blütenorganen (Decourteix *et al.*, 2006). In männlichen Zapfen zeigte sich die Expression beider *SUT* aus *P. sylvestris* besonders stark in den Pollenkörnern und im Tapetum, also der Nährschicht, die sich innerhalb eines Pollensacks befindet (Abbildung 25A, C). Da die einzelnen Pollenkörner innerhalb des Pollensacks symplastisch isoliert sind, ist eine Versorgung mit Kohlenhydraten aus dem Tapetum notwendig, sodass die Pollenkörner mithilfe von SUT in der Lage sind, Saccharose aufzunehmen zu können. In *Arabidopsis*, Tabak und Reis konnten bereits SUT in den Pollenkörnern lokalisiert werden (Stadler *et al.*, 1999; Lemoine *et al.*, 1999; Hirose *et al.*, 2010). Beispielsweise

wurde für AtSUT1 aus *Arabidopsis* gezeigt, dass das Protein eine wichtige Rolle während der Pollenkeimung einnimmt (Sivitz *et al.*, 2008).

Auffällig ist, dass sowohl *PsySUT1* als auch *PsySUT2* in allen untersuchten Geweben stets in denselben Zellen exprimiert zu sein scheinen, sodass eine Interaktion der beiden Proteine miteinander denkbar ist. Die Fähigkeit zur Interaktion unterschiedlicher SUT aus der Tomate wurde anhand der Bildung von Homo- und Heterooligomeren durch die Verwendung von einem *yeast two-hybrid split-ubiquitin*-Assay bewiesen (Reinders *et al.*, 2002). Die Interaktion *in planta* muss jedoch noch experimentell nachgewiesen werden. Die Funktion der Homo- und Heterooligomere der SUT sind ebenfalls noch unbekannt.

## **4.5 Trockenstress in jeweils zwei ausgewählten Nadel- und Laubbaumarten**

Der Assimilattransport von photosynthetisch aktivem Gewebe zu Organen des Verbrauchs ist einer der wichtigsten Faktoren für das Pflanzenwachstum. Abiotische Faktoren, allen voran Trockenstress, haben einen negativen Einfluss auf die Kohlenstoffbalance der Pflanze. Für SUT, welche am Assimilattransport beteiligt sind, wurde bereits mehrfach gezeigt, dass sie an der Reaktion auf den Stressfaktor Trockenheit eine tragende Rolle spielen (Lemoine *et al.*, 2013; Xu *et al.*, 2018).

### **4.5.1 Einfluss von Trockenstress auf den Wasser- und Chlorophyllgehalt**

Die beiden Vertreter der Gymnospermen *P. sylvestris* und *P. abies* hielten dem Trockenstress 5 Wochen stand. Am Habitus ließ sich nach 5 Wochen erkennen, dass die Nadeln und Sprosse von *P. sylvestris* kaum Veränderungen zeigten, wohingegen *P. abies* einen deutlichen Turgorverlust erlitten hat und damit Welkesymptome zeigte (Abbildung 26B, F). Die Auswirkungen auf den Habitus machten sich ebenfalls im Chlorophyllgehalt bemerkbar. Während dieser bei *P. sylvestris* konstant blieb, gab es nach 5 Wochen ohne Bewässerung eine signifikante Abnahme des Blattgrüns bei *P. abies* (Abbildung 26D, H). Der nahezu konstant bleibende Chlorophyllgehalt von *P. sylvestris* ist auf eine größere Widerstandsfähigkeit gegen Trockenheit zurückzuführen (Yang *et al.*, 2021). Die Abnahme vom Chlorophyll wurde bereits in Koniferen unter starkem Trockenstress beobachtet (Alonso *et al.*, 2001; Miron und Sumalan, 2015) und es wird angenommen, dass der Abbau von Chlorophyll durch die Beschädigung der Chloroplasten durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) ausgelöst wird (Smirnoff, 1993; Foyer *et al.*, 1994).

Des Weiteren wurde der Abbau von Chlorophyll mit einer Seneszenzreaktion assoziiert, bei dem die Pflanze Nährstoffe, Energie und Moleküle remobilisiert, um sie wiederzuverwenden (Kim *et al.*, 2016). Seneszenz ist das letzte Stadium im Lebenszyklus einer Pflanze und beschreibt einen geordneten physiologischen Prozess des Alterns, die Seneszenz endet daher im Tod des betroffenen Gewebes (Schippers *et al.*, 2015). Üblicherweise tritt die Seneszenz bei Laubbäumen im Herbst auf, wenn die Vegetationsperiode vorbei ist, durch den Abbau von Chlorophyll verfärbten sich die Blätter gelb oder rot (Lee *et al.*, 2003). Ein frühzeitiges Einsetzen der Seneszenz kann durch bestimmte Umwelteinflüsse eingeleitet werden, zu denen auch der Trockenstress gehört (Munné-Bosch, 2008; Kim *et al.*, 2018). Neben der Bildung von ROS kann also auch eine beginnende Seneszenz für den Abbau von Chlorophyllen unter dem Einfluss von Trockenstress sorgen. Vom Wasserverlust im Gewebe waren bei *P. sylvestris* vor allem die Rinde betroffen (Abbildung 27B), wohingegen bei *P. abies* nach 5 Wochen in allen untersuchten Geweben ein signifikanter Verlust an Wasser zu verzeichnen war (Abbildung 27D), deutlich erkennbar an der geringeren Turgeszenz der Pflanzen (Abbildung 26F). Dabei ist ein konstant hoher Wassergehalt für Pflanzen essentiell, um den Assimilattransport aufrecht zu erhalten (Stanfield und Bartlett, 2022). *P. sylvestris* nutzt das frühe Schließen der Stomata, um Trockenheit zu vermeiden (Martínez-Vilalta *et al.*, 2004), jedoch sind sowohl *P. sylvestris* als auch *P. abies* den hydrostabilen (isohydrischen) Pflanzen zuzuordnen (Lyr, 1992). Der Überlebensmechanismus isohydrischer Pflanzen besteht darin, den Wassergehalt im Gewebe durch ein frühzeitiges Schließen der Stomata möglichst lang auf einem hohen Niveau zu halten (McDowell *et al.*, 2008). Der hier deutlich höher ausfallende Wasserverlust bei *P. abies* lässt sich damit erklären, dass *P. abies* im Gegensatz zu *P. sylvestris* durch Unterschiede in der Einschränkung der stomatären Leitfähigkeit die Spaltöffnungen etwas später schließt und deshalb auch deutlich schneller signifikante Änderungen im Wassergehalt zeigte (Zang *et al.*, 2011; Zang *et al.*, 2012).

Die beiden untersuchten Laubbäume *Q. robur* und *F. sylvatica* hingegen zeigten nach 3 Wochen eine deutliche Blattseneszenz, das Laub begann abzufallen. Die Blätter, die sich noch an den Versuchsbäumen befanden, haben deutlich an Wasser und Blattgrün verloren, was sich auch in den Messungen zum Wasser- und Chlorophyllgehalt zeigte (Abbildungen 32 und 33). Die Abnahme an Chlorophyll lässt sich hier durch die trockenheitsbedingte Seneszenz erklären, das Chlorophyll wurde abgebaut, um die Nährstoffe in anderem Gewebe wiederzuverwenden. Auch die Produktion von ROS und

die damit verbundenen Schäden am Photosyntheseapparat könnten maßgeblich an der Abnahme vom Chlorophyll beteiligt sein. Die Veränderungen im Wassergehalt zeigen sich bei *Q. robur* und *F. sylvatica* am stärksten im Laub, wobei in den Trockenstresspflanzen von *F. sylvatica* auch im Holz ein signifikanter Wasserverlust gemessen wurde. Als anisohydrisch auf Trockenstress reagierende Pflanzen schließen *Q. robur* und *F. sylvatica* die Stomata erst spät, sodass der Wasserverlust zuerst an den Blättern bemerkbar wird (McDowell *et al.*, 2008). Der höhere Wasserverlust auch in anderen Geweben von *F. sylvatica* bestätigt, dass diese Baumart deutlich empfindlicher auf Trockenstress reagiert als *Q. robur* (Zang *et al.*, 2011; Meyer *et al.*, 2020).

#### 4.5.2 Einfluss von Trockenstress auf die Expression von Saccharosetransportern

Bei den Zuckertransportern der untersuchten Gymnospermen waren nur wenig Veränderungen in der Expression zu beobachten. Grundsätzlich zeigte sich *PsySUT1* während des gesamten Experiments mit stark abweichenden Einzelwerten der relativen Expression (Abbildung 28A), weshalb die Standardabweichungen vergleichsweise hoch sind. Das liegt möglicherweise an einer schwachen Expression von *SUT1*, wie bereits der Vergleich von *SUT1* und *SUT2* erwies (Vergleich Abbildung 19). Der Verlauf der Expression während des Experiments zeigte, dass die relative Expression von *PsySUT1* in den Nadeln und dem Holz in der dritten Woche ohne Bewässerung leicht sank, wohingegen es in der Rinde zu einem Anstieg kam. Das deutet darauf hin, dass der Export und die Umwandlung von Saccharose in Stärke vermindert ist, wohingegen die Rückgewinnung in der Rinde erhöht werden könnte, um den Turgor weiterhin auf einem konstanten Niveau zu halten und den Transportfluss im Phloem zu gewährleisten. Im Gegensatz zu *PsySUT1* ist bei *PaSUT1* keine Veränderung der Expression während des Trockenstress-Experiments messbar gewesen, sodass der Trockenstress bei *Picea* keinen Einfluss auf die Expression von *SUT1* hat (Abbildung 28C). Jedoch besteht die Möglichkeit, dass die Aktivität der SUT auf der posttranslationalen Ebene reguliert werden könnte oder dass die Transportproteine ihre Transportrate ohne den Einsatz zusätzlicher Proteine erhöhen könnten (Liesche *et al.*, 2011a; Xu *et al.*, 2018; Ma *et al.*, 2019). So erhöht die Phosphorylierung der SUT die Affinität für Saccharose, wohingegen eine Ubiquitinierung zu einer erhöhten Abbaurate der plasmamembranständigen SUT führt (Ma *et al.*, 2019; Xu *et al.*, 2020). Für *AtSUC2* aus *A. thaliana* wurde bereits gezeigt, dass es eine posttranslationale Kontrolle der SUT-Aktivität geben muss, da die Menge des SUT-Proteins nicht mit der gemessenen Transportrate korrelierte (Sakr *et al.*, 1997).

Auch eine Änderung der Regulation auf posttranskriptionaler Ebene ist möglich, da beispielsweise bei LeSUT1 aus Tomate bei veränderten abiotischen Faktoren eine höhere Proteinaktivität festgestellt wurde, ohne dass das Expressionsniveau sich verändert hat (Khadilkar *et al.*, 2016). Die Expression von *PsySUT2* zeigte sich deutlich stabiler im Vergleich zu *PsySUT1*, hier ist lediglich in den Nadeln eine Erhöhung der Expression von *PsySUT2* nach drei Wochen ohne Bewässerung messbar (Abbildung 28B). Die höhere Expression von *PsySUT2* könnte auf einen erhöhten Exportbedarf hindeuten, um mit der exportierten Saccharose das osmotische Potential im Phloem aufrecht zu erhalten, damit die Pflanze vor Embolien geschützt wird (Sala *et al.*, 2010). Weiterhin ist eine Erhöhung des Saccharosetransports bei Trockenstress wichtig, um das Wurzelwachstum zu unterstützen. So wurden bei *Arabidopsis* unter Trockenstress eine erhöhte Expression der *SUT* sowohl in den Blättern als auch in den Wurzeln gemessen und mit einer erhöhten Versorgung der Wurzeln mit Nährstoffen in Verbindung gebracht (Durand *et al.*, 2016). Die Expression von *PaSUT2* zeigt sich ähnlich stabil wie die Expression von *PsySUT2*, eine Erhöhung der Expression während des Versuchsverlaufes konnte in den Nadeln gemessen werden (Abbildung 28D). Die Erhöhung der Expression vom *SUT* desselben Typs im selben Organ der beiden Koniferen weisen darauf hin, dass die Reaktion auf Trockenstress einheitlich ist und vermutlich zu einer Erhöhung des Saccharoseexports führt. Bisherige Studien zeigten, dass bei phloemlokalisierten *SUT* aus *Arabidopsis thaliana* und *Glycine max*, welche beide zu den apoplastisch beladenden Pflanzenarten gezählt werden, unter dem Einfluss vom Trockenstress ebenfalls eine Hochregulation der Expression im Blattgewebe gemessen werden kann (Xu *et al.*, 2018). Die Hochregulation bei den beiden Koniferen könnte also ebenfalls ein weiterer Hinweis auf die Verwendung eines aktiven Beladungsmechanismus sein. Bei den untersuchten *SUT* der Koniferen kam es auch im fortschreitenden Verlauf des Trockenstressexperiments nicht zur Einstellung der Expression. Auch wenn im Zuge von starkem Trockenstress alle Wachstumsprozesse zum Erliegen kommen, werden Zuckertransporter vor allem für die Remobilisierung von Kohlenhydraten aus seneszentem Gewebe benötigt. In Mais wurde bereits eine signifikante Hochregulation von Zuckertransportern in Blättern beobachtet, die sich in den letzten Phasen der Blattseneszenz befanden (Zhang *et al.*, 2014). Eine anhaltende Expression von *SUT* in *P. sylvestris* und *P. abies* kann also auch mit der Remobilisierung von Saccharose in Verbindung gebracht werden.

Bei den untersuchten Angiospermen *Q. robur* und *F. sylvatica* zeigte sich für den *SUT1* aus *Quercus* nach drei Wochen Trockenstress eine deutliche Abnahme der Expression in allen untersuchten Geweben, wohingegen die Expression von *FsSUT1* aus *Fagus* nur in der Rinde deutlich niedriger wurde (Abbildung 34A, D). Für SUT des Typ I, zu denen auch *QrSUT1* und *FsSUT1* gehören, wurde eine Beteiligung an der Phloembeladung postuliert (Riesmeier *et al.*, 1994; Gottwald *et al.*, 2000). Bei einer Abnahme der Expression im Blattgewebe kann deshalb davon ausgegangen werden, dass die Phloembeladung und damit auch der Transport von Assimilaten unter starkem Trockenstress reduziert wird, um die Saccharose für basale physiologische Prozesse nutzen zu können. Auch ein geringerer Bedarf an neuen Transportproteinen, ohne dass die Transportrate verändert wird, kann durch die Abnahme in der Expressionsstärke in Betracht gezogen werden. Bei der Expression von *QrSUT2* und *FsSUT2* gab es keine Veränderung der Expressionsstärke unter dem Einfluss von Trockenstress (Abbildung 34B, E), aber auch hier kann eine posttranslationale Regulation der SUT-Aktivität nicht ausgeschlossen werden. Da die Expression der *SUT* nicht zum Erliegen kommt, sondern ein gewisses Expressionsniveau zumindest beibehält und Expression weiterhin messbar gewesen ist, könnte auch hier darauf hindeuten, dass die Transporter im Zuge der Seneszenz benötigt werden, um die Zucker remobilisieren zu können, damit sie in anderen Organen Verwendung finden. Die Expression von *QrSUT4* zeigte genau wie die Expression des *SUT2* keine signifikanten Änderungen während des Trockenstressexperiments (Abbildung 34C). Im Gegensatz dazu hat die relative Expression von *FsSUT4* in allen untersuchten Geweben in der dritten Woche des Trockenstressexperiments um mehr als das Doppelte zugenommen (Abbildung 34F). Hier zeigt sich also wieder eine stärkere Reaktion von *F. sylvatica* auf Trockenstress als in *Q. robur*, was ebenfalls die These unterstützt, dass *F. sylvatica* deutlich sensitiver auf Trockenstress reagiert (Meyer *et al.*, 2020). *FsSUT4* gehört genau wie *QrSUT4* zu den SUT des Typ III, die hauptsächlich an der Vakuolenmembran lokalisiert sind und an der Saccharoseabgabe in das Cytoplasma beteiligt sind (Endler *et al.*, 2006; Reinders *et al.*, 2008; Schulz *et al.*, 2011). Eine hohe Expression dieser *SUT* sorgt für eine erhöhte Saccharosekonzentration im Cytosol, die sowohl Einfluss auf das osmotische Potential der Zellen hat, als auch sich positiv auf die Aufrechterhaltung des Saccharosetransports auswirkt. Im Kontrast zu der Hochregulation von *FsSUT4* unter dem Einfluss von Trockenstress wurde bei der Pappel, für die ein passiver Phloembeladungsmechanismus angenommen wird, festgestellt, dass *PtaSUT4* unter Trockenstress deutlich schwächer

exprimiert wird (Xue *et al.*, 2016). Sowohl in Pflanzen, die zu der Familie der Solanaceae gehören als auch in *A. thaliana*, ist die Expression von *SUT4* unter dem Einfluss von Trockenstress deutlich erhöht. Im Gegensatz zu den restlichen SUT des Typ III, die bereits lokalisiert wurden, wurden für die *SUT4* aus Solanaceae jedoch gezeigt, dass sie nicht an der Vakuolenmembran, sondern an der Plasmamembran sitzen und nicht primär am Zuckertransport, sondern an Hormonsignalwegen beteiligt sind (Chincinska *et al.*, 2008; Chincinska *et al.*, 2013). Für *FsSUT4* kann eine Rolle in verschiedenen Signalwegen deshalb nicht ausgeschlossen werden. Dennoch weist die gegensätzliche Reaktion von Dikotyledonen auf die Expression von SUT unter Trockenstress darauf hin, dass die Rolle von SUT des Typ III unter Wassermangel noch nicht endgültig geklärt ist und vor allem im Bäumen noch weiter untersucht werden muss.

#### **4.5.3 Einfluss von Trockenstress auf den Gehalt an Zuckern und Stärke**

Sowohl bei *P. sylvestris* als auch bei *P. abies* zeigte sich keine Änderung im Saccharosegehalt unter Trockenstress (Abbildung 29B, F), was im Einklang mit bisherigen Studien mit anderen Koniferen steht (Woodruff, 2014). Bei den Hexosen konnten bei *P. sylvestris* keine signifikanten Änderungen unter dem Einfluss von Trockenstress festgestellt werden, wohingegen es bei *P. abies* in Nadeln und Rinde nach drei Wochen ohne Bewässerung zu einem Anstieg im Hexosegehalt kam (Abbildung 29D, H). Vorherige Studien haben ebenfalls beobachten können, dass sich der Hexosegehalt in zahlreichen Baumarten unter Trockenstress erhöht, während es keine signifikanten Steigerungen im Saccharosegehalt gab (Thompson und Zwieniecki, 2008, 2008; Woodruff, 2014; Lintunen *et al.*, 2016). Das liegt daran, dass Hexosen bei der gleichen molaren Konzentration eine geringere Viskosität im Vergleich zu Saccharose vorweisen und dadurch der Transport der Kohlenhydrate im Phloem durch den osmotischen Ausgleich länger aufrecht erhalten werden kann (Lintunen *et al.*, 2016). Im Gegensatz zu den gemessenen Zuckern waren die Stärkespeicher bei beiden Baumarten in allen untersuchten Geweben nach drei Wochen erschöpft (Abbildung 30B, D). Eine Reduktion des Stärkegehalts, um den Gehalt an löslichen Zuckern aufrecht zu erhalten, wenn die Photosyntheserate reduziert ist, wurde bereits als Reaktion auf Trockenstress beobachtet (Zrenner und Stitt, 1991; Liu *et al.*, 2019; He *et al.*, 2020). Dabei wird die Stärke zu Saccharose, Fruktose und Glukose abgebaut, um physiologische Prozesse (Épron und Dreyer, 1996; Smith und Stitt, 2007; Kannenberg und Phillips, 2020) oder das osmotische Potential aufrecht zu erhalten (siehe Kapitel 4.5.2).

Bei den beiden Vertretern der Fagaceae *Q. robur* und *F. sylvatica* konnte ebenfalls keine Veränderung im Saccharosegehalt festgestellt werden, während der Gehalt an Hexosen unter dem Einfluss von Trockenstress in allen untersuchten Geweben beider Baumarten deutlich zunahm (Abbildung 35). Der Stärkegehalt in *Q. robur* und *F. sylvatica* verringerte sich schon ab der zweiten Woche des Trockenstressexperiments deutlich und war nach drei Wochen nahezu erschöpft (Abbildung 36). Hier wurden, wie bei den Pinaceae auch, die Stärkereserven aufgebraucht, um den Gehalt an löslichen Zuckern aufrecht zu erhalten. Die Zunahme der Hexosen beruht hier vermutlich auch auf dem Stärkeabbau und dient durch die geringere Viskosität im Vergleich mit Saccharose einem längeren Aufrechterhalten des Phloemtransportflusses. Durch die Aufspaltung der komplexen Stärke in lösliche Zucker wird zudem das Aufrechterhalten von basalen physiologischen Prozessen gewährleistet.

#### 4.5.4 Einfluss von Trockenstress auf anorganische Ionen

Neben Zuckern sind auch anorganische Ionen für die osmotische Regulation unter dem Einfluss von Trockenstress wichtig (Shabala und Lew, 2002). Sowohl in *P. sylvestris* als auch in *P. abies* gab es keine signifikante Änderung im Anionen- oder Kationengehalt unter Trockenstress (Abbildung 31). Auch bei den Fagaceae zeigte sich bei *Q. robur* ebenfalls keine Änderung im Gehalt der gemessenen Anionen und Kationen (Abbildung 36A, B). Bei *F. sylvatica* konnte keine Veränderung im Kationengehalt unter Trockenstress festgestellt werden, jedoch zeigte sich im Anionengehalt der Rinde eine leichte Abnahme nach drei Wochen des Trockenstressexperiments (Abbildung 36C, D). Die Abnahmen des Anionengehaltes kann mit einer verringerten Aufnahme durch die Wurzeln erklärt werden, da die Wasseraufnahme bei starkem Trockenstress in den Wurzeln aufhört und so auch die Aufnahme von gelösten Ionen aus dem Boden gestört ist (Hu und Schmidhalter, 2005). Unter den gemessenen Anionen befanden sich neben  $\text{Cl}^-$ , welches den größten Anteil an anorganischen Ionen in pflanzlichem Gewebe ausmacht, auch die Anionen  $\text{PO}_4^-$  und  $\text{SO}_4^-$ , die sowohl für den Aufbau von Aminosäuren, DNA und RNA, als auch für den Energietransfer wichtig sind (Rengel *et al.*, 2021). Da das Wachstum unter Trockenstress eingeschränkt wird, um basale physiologische Prozesse länger aufrechterhalten zu können, sinkt erst einmal der Bedarf an Anionen zur Neusynthese, womit sich ein unveränderter Anionengehalt erklären lässt. Im Zuge der Seneszenzreaktion kommt es in den seneszenten Blättern zu einem Abbau von Proteinen, Nukleinsäuren und Zuckern (Clément *et al.*, 2018), die zur Translokation zur Verfügung stehen, um an anderer Stelle wiederverwendet zu werden, was zusätzlich auch für einen

geringeren Bedarf an Anionen für den Aufbau von Aminosäuren und Nucleinsäuren sorgt.  $\text{Cl}^-$  kommt in pflanzlichem Gewebe hauptsächlich als Gegenion zu dem Kation  $\text{K}^+$  vor.  $\text{K}^+$  spielt eine wichtige Rolle bei der osmotischen Anpassung unter Trockenstress, denn im Gegensatz zu den Zuckern hat  $\text{K}^+$  den Vorteil, dass es die Viskosität nicht beeinflusst und so der Transportfluss länger aufrechterhalten werden kann (Shabala und Lew, 2002). Vorhergehende Studien haben jedoch gezeigt, dass Trockenstress keinen signifikanten Einfluss auf den Kaliumgehalt hat, da die Aufnahme von Kalium aus dem Substrat deutlich reduziert ist (Fayyaz *et al.*, 2013). Kein Anstieg im Kationengehalt lässt sich also damit erklären, dass die Wurzeln den Mehrbedarf an Kalium nicht decken können und so der Kaliumgehalt unverändert bleibt, da die Aufnahme durch trockenes Substrat verhindert wird (Wang *et al.*, 2013; Santos *et al.*, 2021). Eine weitere Erklärung für den unveränderten Kaliumgehalt unter Trockenstress kann der gleichbleibende Saccharosegehalt sein. So haben aktuelle Studien ergeben, dass es bei einer Reduktion des Saccharosegehalts zur Erhöhung des Kaliumgehalts kommt, um den Druckstrom im Leitgewebe aufrecht zu erhalten (Babst *et al.*, 2022). Auch wenn Saccharose als maßgeblicher Antrieb für die Druckstromtheorie gilt, ist sie nicht zwingend notwendig, um das osmotische Potential aufrecht zu erhalten. Da es bei den untersuchten Bäumen jedoch nicht zu einem signifikanten Verlust an Saccharose gekommen ist, muss das osmotische Potential nicht mit dem Import von Kalium ausgeglichen werden.

## 5. Fazit und Ausblick

### 5.1 Phloembeladung in *P. sylvestris*

Für die Gymnosperme *P. sylvestris* wurde aufgrund der hohen Anzahl an kontinuierlichen plasmodesmatischen Verbindungen in den Zellen zwischen dem Mesophyll bis zu den Siebzellen und einer hohen Osmolarität in den Nadeln die passive Phloembeladung angenommen (Blehschmidt-Schneider *et al.*, 1997; Liesche *et al.*, 2011b; Liesche und Schulz, 2012). Die Untersuchungen im ersten Teil der Arbeit deuten darauf hin, dass die Phloembeladung bei *P. sylvestris* auch aktive Schritte beinhaltet. Im Transkriptom von *P. sylvestris* konnten zwei Saccharosetransporter, *PsySUT1* und *PsySUT2*, identifiziert werden. Durch phylogenetische Untersuchungen ließ sich *PsySUT2* den SUT des Typ II zuordnen, wohingegen *PsySUT1* zu den SUT des Typ I G gehört. Die beiden identifizierten *SUT* sind sowohl in allen generativen als auch in allen vegetativen, oberirdisch gelegenen Organen exprimiert. Neben der gewebespezifischen Expression konnte auch die zellgenaue Expression der *SUT* mittels mRNA *in-situ*-Hybridisierung visualisiert werden. Die zellspezifische Expression beider *SUT* in den Strasburgerzellen des Phloems adulter Nadeln spricht dafür, dass aktive Transportschritte im *pre-phloem pathway* vorliegen und somit eine aktive Phloembeladung nicht ausgeschlossen werden kann. Des Weiteren wurde Transkript beider *SUT* sowohl in den *sinks* als auch im Phloem der Sprossachse nachgewiesen, was darauf hindeutet, dass die *SUT* am Import von Saccharose in heterotrophe Gewebe und an der Rückgewinnung von ausgetretener Saccharose entlang des Transportphloems beteiligt sind. Da die Transportfähigkeit der beiden *SUT* in dieser Arbeit noch nicht bewiesen werden konnte, muss die biochemische Funktionscharakterisierung noch vorgenommen werden. Hierfür eignet sich vor allem das Protoplasten-Esculin-Assay, welches von Rottmann *et al.* (2018) zur Beurteilung der Saccharoseaufnahme entwickelt wurde. Durch eine zusätzliche Markierung mit einem Fluoreszenzprotein kann durch die Expression in Mesophyllprotoplasten ebenfalls die subzelluläre Lokalisation beurteilt werden. Neben ihrer Lokalisation an der Plasmamembran können *SUT* auch an der Vakuolenmembran sitzen und durch ihre Aktivität die cytoplasmatische Saccharosekonzentration regulieren, um so die Phloembeladungsrate zu beeinflussen. Da die Gymnospermen-*SUT* im Stammbaum zwischen dem Typ I und dem Typ III ihren eignen Subcluster bilden, ist die Funktion und Lokalisation noch nicht eindeutig geklärt. Durch die große Ähnlichkeit zu *PaSUT1* (Fink, 2019), der in einem einmaligen Experiment an der Vakuolenmembran lokalisierte, und der fehlende Nachweis eines *SUT* des Typ III ist die subzelluläre Lokalisation von

PsySUT1 am Tonoplasten wahrscheinlich und muss ebenfalls experimentell bewiesen werden. Die Aufklärung der subzellulären Lokalisation und Funktion von Gymnospermen-SUT könnten neue Erkenntnisse zum Verständnis der phylogenetischen Einordnung und der Funktion des Phloembeladungsmechanismus liefern. Zur Beurteilung des eingesetzten Transportmechanismus könnte auch die Hemmung von SUT in den Nadeln mittels PCMBS eingesetzt werden (van Bel *et al.*, 1993; Turgeon und Medville, 2004). Die Lokalisation der SUT-Proteine mithilfe von Antikörpern könnte ebenfalls bei der Identifikation der Funktion helfen, da der Expressionsort und die Lokalisation der Proteine in unterschiedlichen Zellen liegen können. Die Aufklärung der Funktionsweise des Phloemtransports in *Pinus sylvestris* kann hilfreich sein, um den Phloembeladungsmechanismus in Gymnospermen zu verstehen und damit zum Verständnis der Entwicklung des Langstreckentransports in Landpflanzen beitragen (Liesche *et al.*, 2011b; Liesche, 2017).

## 5.2 Trockenstress in europäischen Nadel- und Laubbäumen

Die Untersuchungen zum Trockenstress in den Nadelbäumen *Pinus sylvestris* und *Picea abies* und den Laubbäumen *Quercus robur* und *Fagus sylvatica* haben gezeigt, dass die Reaktion auf osmotischen Stress in einigen Aspekten gleich ist. So ließ sich in allen untersuchten Bäumen eine deutliche Abnahme im Stärkegehalt mit einer gleichzeitigen Zunahme im Hexosegehalt feststellen, wobei der Abbau der Stärke zu Zuckern voraussichtlich dazu dient, physiologische Prozesse aufrecht zu erhalten und zur osmotischen Regulation beizutragen. In den Messungen zum Chlorophyll- und Wassergehalt hat sich herausgestellt, dass *P. sylvestris* durch den geringeren Wasser- und Chlorophyllverlust deutlich trockenstressresistenter ist als *P. abies*. Bei den beiden Laubbäumen war *F. sylvatica* durch die ausgeprägtere Abnahme vom Wasser- und Chlorophyllgehalt deutlich stärker vom Trockenstress betroffen als *Q. robur*. Die Abnahme im Chlorophyllgehalt ist dabei vermutlich das Ergebnis der eintretenden Seneszenz und der trockenstressbedingten Produktion von ROS. Die Untersuchungen zur Expression der verschiedenen SUT unter Trockenstress zeigte jedoch keine allgemeingültige Hoch- oder Runterregulation, ein direkter Zusammenhang zwischen SUT-Expression und dem Zuckergehalt kann also nicht erkannt werden. Die Regulation der SUT ist komplex und kann auf unterschiedliche Art und Weise gesteuert werden (Stanfield und Bartlett, 2022). Die Hochregulation des SUT2 in den Nadeln der Bäume in *P. sylvestris* und *P. abies* deutet auf eine Erhöhung des Saccharoseexports hin. Vor

allem phloemlokalisierte *SUT* zeigten in vorherigen Studien eine Hochregulation der Expression im Blattgewebe unter Trockenstress (Xu *et al.*, 2018). Dennoch konnte bei den Transportern *PaSUT1*, *QrSUT2*, *FsSUT2* und *QrSUT4* keine signifikante Änderung in der Expression unter Trockenstress festgestellt werden. Für zukünftige Forschungsprojekte bietet sich die Untersuchung der Regulation auf posttranskriptionaler oder posttranslationaler Ebene an, da sie auch bei anderen *SUT* unter dem Einfluss von abiotischen Stressfaktoren vermutet wurde (Liesche *et al.*, 2011a; Xu *et al.*, 2018). Bei weiteren Versuchsdurchführungen sollten zudem verschiedene Arten von Trockenstress berücksichtigt werden, neben dem schweren Trockenstress bieten sich hier noch ein milder oder moderater Trockenstress an, um die Reaktion der *SUT* auf diesen abiotischen Faktor noch genauer zu untersuchen. Zudem könnten Wiederbewässerungsexperimente nach Trockenheit noch weitere Informationen zur Regulation der Expression der *SUT* bei Trockenstress liefern. Um den Zusammenhang zwischen Trockenstress und der Expression der *SUT* besser zu verstehen, würde die Messung der Flussrate des Phloemsafts mit bildgebenden Verfahren (Kumar *et al.*, 2022) in Kombination mit Expressionsmessungen zur Aufklärung der Beteiligung am Phloemtransport beitragen.

## Literaturverzeichnis

- Ageeva MV, Petrovská B, Kieft H, Sal'nikov VV, Snegireva AV, van Dam JEG, van Veenendaal WLH, Emons AMC, Gorshkova TA, van Lammeren AAM. 2005.** Intrusive growth of flax phloem fibers is of intercalary type. *Planta* **222**: 565–574.
- Allen CD, Breshears DD, McDowell NG. 2015.** On underestimation of global vulnerability to tree mortality and forest die-off from hotter drought in the Anthropocene. *Ecosphere* **6**: art129.
- Allen CD, Macalady AK, Chenchouni H, Bachelet D, McDowell N, Vennetier M, Kitzberger T, Rigling A, Breshears DD, Hogg EH, Gonzalez P, Fensham R, et al. 2010.** A global overview of drought and heat-induced tree mortality reveals emerging climate change risks for forests. *Forest Ecology and Management* **259**: 660–684.
- Alonso R, Elvira S, Castillo FJ, Gimeno BS. 2001.** Interactive effects of ozone and drought stress on pigments and activities of antioxidative enzymes in *Pinus halepensis*. *Plant Cell Environ* **24**: 905–916.
- Aoki N, Hirose T, Scofield GN, Whitfield PR, Furbank RT. 2003.** The Sucrose Transporter Gene Family in Rice. *Plant Cell Physiol.* **44**: 223–232.
- Atkins CA, Smith PMC, Rodriguez-Medina C. 2011.** Macromolecules in phloem exudates--a review. *Protoplasma* **248**: 165–172.
- Babst BA, Braun DM, Karve AA, Frank Baker R, Tran TM, Kenny DJ, Rohlhill J, Knoblauch J, Knoblauch M, Lohaus G, Tappero R, Scherzer S, et al. 2022.** Sugar loading is not required for phloem sap flow in maize plants. *Nature plants* **8**: 171–180.
- Bagnall N, Wang X-D, Scofield GN, Furbank RT, Offler CE, Patrick JW. 2000.** Sucrose transport-related genes are expressed in both maternal and filial tissues of developing wheat grains. *Functional Plant Biol.* **27**: 1009.
- Barker L, Kühn C, Weise A, Schulz A, Gebhardt C, Hirner B, Hellmann H, Schulze W, Ward JM, Frommer WB. 2000.** SUT2, a Putative Sucrose Sensor in Sieve Elements. *The Plant Cell*: 1153–1164.
- Bedon F, Grima-Pettenati J, Mackay J. 2007.** Conifer R2R3-MYB transcription factors: sequence analyses and gene expression in wood-forming tissues of white spruce (*Picea glauca*). *BMC plant biology* **7**: 17.

- Blechsmidt-Schneider S, Eschrich W, Jahnke S. 1997.** Phloem loading, translocation, and unloading processes. *Trees: contributions to modern tree physiology*: 139–163.
- Braun DM, Slewinski TL. 2009.** Genetic control of carbon partitioning in grasses: roles of sucrose transporters and tie-dyed loci in phloem loading. *Plant physiology* **149**: 71–81.
- Bresinsky A, Körner C, Kadereit JW, Neuhaus G, Sonnewald U. 2008.** *Lehrbuch der Botanik*, 36. Aufl. Heidelberg: Spektrum Akad. Verl.
- Bush DR. 1990.** Electrogenicity, pH-Dependence, and Stoichiometry of the Proton-Sucrose Symport. *Plant physiology* **93**: 1590–1596.
- Byrne DN, Miller WB. 1990.** Carbohydrate and amino acid composition of phloem sap and honeydew produced by *Bemisia tabaci*. *Journal of Insect Physiology* **36**: 433–439.
- Campanella JJ, Bitincka L, Smalley J. 2003.** MatGAT: An application that generates similarity/identity matrices using protein or DNA sequences. *BMC Bioinformatics* **4**: 29.
- Canny MJ. 1993.** Transfusion tissue of pine needles as a site of retrieval of solutes from the transpiration stream. *New Phytol* **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, Qu X-Q, Hou B-H, Sosso D, Osorio S, Fernie AR, Frommer WB. 2012.** Sucrose Efflux Mediated by SWEET Proteins as a Key Step for Phloem Transport. *Science* **335**: 207–211.
- Chincinska I, Gier K, Krügel U, Liesche J, He H, Grimm B, Harren FJM, Cristescu SM, Kühn C. 2013.** Photoperiodic regulation of the sucrose transporter StSUT4 affects the expression of circadian-regulated genes and ethylene production. *Frontiers in plant science* **4**: 26.
- Chincinska IA, Liesche J, Krügel U, Michalska J, Geigenberger P, Grimm B, Kühn C. 2008.** Sucrose transporter StSUT4 from potato affects flowering, tuberization, and shade avoidance response. *Plant physiology* **146**: 515–528.
- Christenhusz MJM, Reveal JL, Farjon A, Gardner MF, Mill RR, Chase MW. 2011.** A new classification and linear sequence of extant gymnosperms. *Phytotaxa* **19**: 55.

- Clément G, Moison M, Soulay F, Reisdorf-Cren M, Masclaux-Daubresse C. 2018.** Metabolomics of laminae and midvein during leaf senescence and source-sink metabolite management in *Brassica napus* L. leaves. *J Exp Bot* **69**: 891–903.
- Crang R, Lyons-Sobaski S, Wise R. 2019.** Phloem. In: Crang RFE, Lyons-Sobaski S, Wise R, eds. *Plant anatomy: A concept-based approach to the structure of seed plants*. Cham, Switzerland: Springer Nature Publishing, 247–275.
- Crepeau MW, Langley CH, Stevens KA. 2017.** From Pine Cones to Read Clouds: Rescaffolding the Megagenome of Sugar Pine (*Pinus lambertiana*). *G3 (Bethesda, Md.)* **7**: 1563–1568.
- Dai A. 2013.** Increasing drought under global warming in observations and models. *Nature Clim Change* **3**: 52–58.
- De Schepper V, De Swaef T, Bauweraerts I, Steppe K. 2013.** Phloem transport: a review of mechanisms and controls. *Journal of experimental botany* **64**: 4839–4850.
- Decourteix M, Alves G, Brunel N, Améglio T, Guilliot A, Lemoine R, Pétel G, Sakr S. 2006.** JrSUT1, a putative xylem sucrose transporter, could mediate sucrose influx into xylem parenchyma cells and be up-regulated by freeze–thaw cycles over the autumn–winter period in walnut tree (*Juglans regia* L.). *Plant, cell & environment* **29**: 36–47.
- Dobbelstein E, Fink D, Öner-Sieben S, Czempik L, Lohaus G. 2018.** Seasonal changes of sucrose transporter expression and sugar partitioning in common European tree species. *Tree physiology* **39**: 284–299.
- Dotzauer D, Wolfenstetter S, Eibert D, Schneider S, Dietrich P, Sauer N. 2010.** Novel PSI domains in plant and animal H<sup>+</sup>-inositol symporters. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* **11**: 767–781.
- Durand M, Porcheron B, Hennion N, Maurousset L, Lemoine R, Pourtau N. 2016.** Water Deficit Enhances C Export to the Roots in *Arabidopsis thaliana* Plants with Contribution of Sucrose Transporters in Both Shoot and Roots. *Plant physiology* **170**: 1460–1479.
- Endler A, Meyer S, Schelbert S, Schneider T, Weschke W, Peters SW, Keller F, Baginsky S, Martinoia E, Schmidt UG. 2006.** Identification of a vacuolar sucrose transporter in barley and *Arabidopsis* mesophyll cells by a tonoplast proteomic approach. *Plant physiology* **141**: 196–207.
- Épron D, Dreyer E. 1996.** Starch and soluble carbohydrates in leaves of water-stressed oak saplings. *Annales des sciences forestières*: 263–268.

- Esau K. 1969.** *The phloem*. Berlin: Gebrüder Borntraeger.
- Evert RF, Eichhorn SE, Langenfeld-Heysler R. 2009.** *Esaus Pflanzenanatomie: Meristeme, Zellen und Gewebe der Pflanzen - ihre Struktur, Funktion und Entwicklung*. Berlin: De Gruyter.
- Fayyaz P, Etemadi E, Julaiee-Manesh N, Zolfaghari R. 2013.** Sodium and potassium allocation under drought stress in Atlas mastic tree (*Pistacia atlantica* subsp. *mutica*). *iForest* **6**: 90–94.
- Fink D.** Phloembeladung und Zuckertransport in ausgewählten Gymnospermen. *Dissertation*, in press.
- Foyer CH, Lelandais M, Kunert KJ. 1994.** Photooxidative stress in plants. *Physiol Plant* **92**: 696–717.
- 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 Biol.* **28**: 1187.
- Gadek PA, Quinn CJ. 1988.** Pitting of Transfusion Tracheids in Cupressaceae. *Aust. J. Bot.* **36**: 81.
- Gamalei Y. 1989.** Structure and function of leaf minor veins in trees and herbs. *Trees* **3**: 96–110.
- Gora PJ, Reinders A, Ward JM. 2012.** A novel fluorescent assay for sucrose transporters. *Plant methods* **8**: 13.
- Gorshkova T, Brutch N, Chabbert B, Deyholos M, Hayashi T, Lev-Yadun S, Mellerowicz EJ, Morvan C, Neutelings G, Pilate G. 2012.** Plant Fiber Formation: State of the Art, Recent and Expected Progress, and Open Questions. *Critical Reviews in Plant Sciences* **31**: 201–228.
- 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, Christeller JT, Williams LE, Roeb G, Schurr U, Minchin PEH. 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.
- Hafke JB, van Amerongen J-K, Kelling F, Furch ACU, Gaupels F, van Bel AJE. 2005.** Thermodynamic battle for photosynthate acquisition between sieve tubes and adjoining parenchyma in transport phloem. *Plant physiology* **138**: 1527–1537.
- Han X, Gao C, Liang B, Cui J, Xu Q, Schulz A, Liesche J. 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. *J. Mol. Biol.*: 557–580.
- Hartig T. 1837.** Vergleichende Untersuchungen über die Organisation des Stammes der einheimischen Waldbäume. *J Fort Forstwiss Forstl Naturk*: 125.
- He W, Liu H, Qi Y, Liu F, Zhu X. 2020.** Patterns in nonstructural carbohydrate contents at the tree organ level in response to drought duration. *Global change biology* **26**: 3627–3638.
- Hirose T, Zhang Z, Miyao A, Hirochika H, Ohsugi R, Terao T. 2010.** Disruption of a gene for rice sucrose transporter, OsSUT1, impairs pollen function but pollen maturation is unaffected. *Journal of experimental botany* **61**: 3639–3646.
- Hu Y, Schmidhalter U. 2005.** Drought and salinity: A comparison of their effects on mineral nutrition of plants. *Z. Pflanzenernähr. Bodenk.* **168**: 541–549.
- Ibraheem O, Dealtry G, Roux S, Bradley G. 2011.** The effect of drought and salinity on the expressional levels of sucrose transporters in rice (*Oryza sativa* Nipponbare) cultivar plants. *Plant Omics Journal* **4**: 68–74.
- Jones HG. 1998.** Stomatal control of photosynthesis and transpiration. *J Exp Bot* **49**: 387–398.
- Julius BT, Leach KA, Tran TM, Mertz RA, Braun DM. 2017.** Sugar Transporters in Plants: New Insights and Discoveries. *Plant & cell physiology* **58**: 1442–1460.
- Kaku S. 1971.** A possible role of the endodermis as a barrier for ice propagation in the freezing of pine needles. *Plant and Cell Physiology* **12**: 941–948.
- Kannenber SA, Phillips RP. 2020.** Non-structural carbohydrate pools not linked to hydraulic strategies or carbon supply in tree saplings during severe drought and subsequent recovery. *Tree physiology* **40**: 259–271.

- Karlgren A, Carlsson J, Gyllenstrand N, Lagercrantz U, Sundström JF.** Non-radioactive in situ hybridization protocol applicable for Norway spruce and a range of plant species. *Journal of visualized experiments JoVE*, in press.
- Khadilkar AS, Yadav UP, Salazar C, Shulaev V, Paez-Valencia J, Pizzio GA, Gaxiola RA, Ayre BG. 2016.** Constitutive and Companion Cell-Specific Overexpression of AVP1, Encoding a Proton-Pumping Pyrophosphatase, Enhances Biomass Accumulation, Phloem Loading, and Long-Distance Transport. *Plant physiology* **170**: 401–414.
- Kim J, Kim JH, Lyu JI, Woo HR, Lim PO. 2018.** New insights into the regulation of leaf senescence in Arabidopsis. *J Exp Bot* **69**: 787–799.
- Kim J, Woo HR, Nam HG. 2016.** Toward Systems Understanding of Leaf Senescence: An Integrated Multi-Omics Perspective on Leaf Senescence Research. *Molecular plant* **9**: 813–825.
- Knop C, Voitsekhovskaja O, Lohaus G. 2001.** Sucrose transporters in two members of the Scrophulariaceae with different types of transport sugar. *Planta* **213**: 80–91.
- Komarova NY, Meier S, Meier A, Grottemeyer MS, Rentsch D. 2012.** Determinants for Arabidopsis peptide transporter targeting to the tonoplast or plasma membrane. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* **13**: 1090–1105.
- Kühn C. 2003.** A Comparison of the Sucrose Transporter Systems of Different Plant Species. *Plant biol.* **5**: 215–232.
- Kühn C, Grof CPL. 2010.** Sucrose transporters of higher plants. *Current opinion in plant biology* **13**: 288–298.
- Kühn C, Hajirezaei M-R, Fernie AR, Roessner-Tunali U, Czechowski T, Hirner B, Frommer WB. 2003.** The sucrose transporter StSUT1 localizes to sieve elements in potato tuber phloem and influences tuber physiology and development. *Plant Physiol* **131**: 102–113.
- Kumar R, Hosseinzadehtaher M, Hein N, Shadmand M, Jagadish SVK, Ghanbarian B. 2022.** Challenges and advances in measuring sap flow in agriculture and agroforestry: A review with focus on nuclear magnetic resonance. *Frontiers in plant science* **13**: 1036078.
- Lalonde S, Boles E, Hellmann H, Barker L, Patrick JW, Frommer WB, Ward JM. 1999.** The dual function of sugar carriers. Transport and sugar sensing. *The Plant Cell* **11**: 707–726.

- Lalonde S, Frommer WB. 2012.** SUT Sucrose and MST Monosaccharide Transporter Inventory of the *Selaginella* Genome. *Frontiers in plant science* **3**: 24.
- Lalonde S, Weise A, Walsh RP, Ward JM, Frommer WB. 2003.** Fusion to GFP blocks intercellular trafficking of the sucrose transporter SUT1 leading to accumulation in companion cells. *BMC plant biology* **3**: 3–8.
- Lee DW, O'Keefe J, Holbrook NM, Feild TS. 2003.** Pigment dynamics and autumn leaf senescence in a New England deciduous forest, eastern USA. *Ecol Res* **18**: 677–694.
- Lemoine R. 2000.** Sucrose transporters in plants: update on function and structure. *Biochimica et Biophysica Acta* **1456**: 246–262.
- Lemoine R, Bürkle L, Barker L, Sakr S, Kühn C, Regnacq M, Gaillard C, Delrot S, Frommer WB. 1999.** Identification of a pollen-specific sucrose transporter-like protein NtSUT3 from tobacco. *FEBS letters* **454**: 325–330.
- Lemoine R, La Camera S, Atanassova R, Dédaldéchamp F, Allario T, Pourtau N, Bonnemain J-L, Laloi M, Coutos-Thévenot P, Maurousset L, Faucher M, Gironse C, et al. 2013.** Source-to-sink transport of sugar and regulation by environmental factors. *Frontiers in plant science* **4**: 272.
- Liesche J. 2017.** Sucrose transporters and plasmodesmal regulation in passive phloem loading. *Journal of integrative plant biology* **59**: 311–321.
- Liesche J, Krügel U, He H, Chincinska I, Hackel A, Kühn C. 2011a.** Sucrose transporter regulation at the transcriptional, post-transcriptional and post-translational level. *Journal of Plant Physiology* **168**: 1426–1433.
- Liesche J, Martens HJ, Schulz A. 2011b.** Symplasmic transport and phloem loading in gymnosperm leaves. *Protoplasma* **248**: 181–190.
- 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. 2018.** Phloem transport in gymnosperms: a question of pressure and resistance. *Current opinion in plant biology* **43**: 36–42.
- Liesche J, Windt C, Bohr T, Schulz A, Jensen KH. 2015.** Slower phloem transport in gymnosperm trees can be attributed to higher sieve element resistance. *Tree physiology* **35**: 376–386.
- Lintunen A, Paljakka T, Jyske T, Peltoniemi M, Sterck F, Arx G von, Cochard H, Copini P, Caldeira MC, Delzon S, Gebauer R, Grönlund L, 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.
- Liu H, Shangguan H, Zhou M, Airebule P, Zhao P, He W, Xiang C, Wu X. 2019.** Differentiated responses of nonstructural carbohydrate allocation to climatic dryness and drought events in the Inner Asian arid timberline. *Agricultural and Forest Meteorology* **271**: 355–361.
- Lohaus G, Pennewiss K, Sattelmacher B, Hussmann M, Hermann Muehling K. 2001.** Is the infiltration-centrifugation technique appropriate for the isolation of apoplastic fluid? A critical evaluation with different plant species. *Physiologia plantarum* **111**: 457–465.
- Lohaus G, Winter H, Riens B, Heldt 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.
- Lyr H. 1992.** *Physiologie und Ökologie der Gehölze: Mit 85 Tabellen*. Jena, Stuttgart: G. Fischer.
- Ma Q-J, Sun M-H, Lu J, Kang H, You C-X, Hao Y-J. 2019.** An apple sucrose transporter MdSUT2.2 is a phosphorylation target for protein kinase MdCIPK22 in response to drought. *Plant biotechnology journal* **17**: 625–637.
- Marger MD, Saier MH. 1993.** A major superfamily of transmembrane facilitators that catalyse uniport, symport and antiport. *Trends in Biochemical Sciences* **18**: 13–20.
- Martínez-Vilalta J, Sala A, Piñol J. 2004.** The hydraulic architecture of Pinaceae – a review. *Plant Ecology* **171**: 3–13.
- McDowell N, Pockman WT, Allen CD, Breshears DD, Cobb N, Kolb T, Plaut J, Sperry J, West A, Williams DG, Yezzer EA. 2008.** Mechanisms of plant survival and mortality during drought: why do some plants survive while others succumb to drought? *New Phytol* **178**: 719–739.
- Meyer BF, Buras A, Rammig A, Zang CS. 2020.** Higher susceptibility of beech to drought in comparison to oak. *Dendrochronologia* **64**: 125780.
- Meyer S, Melzer M, Truernit E, Hümmer C, Besenbeck R, Stadler R, Sauer N. 2000.** AtSUC3, a gene encoding a new Arabidopsis sucrose transporter, is expressed in cells adjacent to the vascular tissue and in a carpel cell layer. *The Plant Journal* **24**: 869–882.

- Miehe W, Czempik L, Klebl F, Lohaus G. 2022.** Sugar concentrations and expression of SUTs suggest active phloem loading in tall trees of *Fagus sylvatica* and *Quercus robur*. *Tree physiology*, in press.
- Minchin PEH, Thorpe MR. 1987.** Measurement of Unloading and Reloading of Photo-assimilate within the Stem of Bean. *J Exp Bot* **38**: 211–220.
- Miron MS, Sumalan RL. 2015.** Physiological responses of Norway spruce (*Picea abies* [L.] Karst) seedlings to drought and overheating stress conditions. *Journal of Horticulture, Forestry and Biotechnology* **12**: 146–151.
- Mosca E, Cruz F, Gómez-Garrido J, Bianco L, Rellstab C, Brodbeck S, Csilléry K, Fady B, Fladung M, Fussi B, Gömöry D, González-Martínez SC, et al. 2019.** A Reference Genome Sequence for the European Silver Fir (*Abies alba* Mill.): A Community-Generated Genomic Resource. *G3 (Bethesda, Md.)* **9**: 2039–2049.
- Münch E. 1930.** *Die Stoffbewegungen in der Pflanze*. Jena: Gustav Fischer.
- Munné-Bosch S. 2008.** Do perennials really senesce? *Trends in Plant Science* **13**: 216–220.
- 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.
- Niu S, Li J, Bo W, Yang W, Zuccolo A, Giacomello S, Chen X, Han F, Yang J, Song Y, Nie Y, Zhou B, et al. 2022.** The Chinese pine genome and methylome unveil key features of conifer evolution. *Cell* **185**: 204-217.e14.
- Nystedt B, Street NR, Wetterborn A, Zuccolo A, Lin Y-C, Scofield DG, Vezzi F, Delhomme N, Giacomello S, Alexeyenko A, Vicedomini R, Sahlin K, et al. 2013.** The Norway spruce genome sequence and conifer genome evolution. *Nature* **497**: 579–584.
- Ochoa-Fernandez R, Samodelov SL, Brandl SM, Wehinger E, Müller K, Weber W, Zurbriggen MD. 2016.** Optogenetics in Plants: Red/Far-Red Light Control of Gene Expression. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **1408**: E1.
- Ohshima T, Hayashi H, Chino M. 1990.** Collection and Chemical Composition of Pure Phloem Sap from *Zea mays* L. *Plant and Cell Physiology* **31**: 735–737.
- Olbrich M, Gerstner E, Welzl G, Fleischmann F, Osswald W, Bahnweg G, Ernst D. 2008.** Quantification of mRNAs and housekeeping gene selection for quantitative real-time RT-PCR normalization in European beech (*Fagus sylvatica* L.) during

- abiotic and biotic stress. *Zeitschrift für Naturforschung. C, Journal of biosciences* **63**: 574–582.
- 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, 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.
- Palmer JD, Soltis DE, Chase MW. 2004.** The plant tree of life: an overview and some points of view. *American Journal of Botany* **91**: 1437–1445.
- Parameswaran N, Liese W. 1970.** Zur Cytologie der Strasburger-Zellen in Coniferennadeln. *Die Naturwissenschaften* **57**: 45–46.
- 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 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, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP. 2004.** Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology letters* **26**: 509–515.
- Rasheed-Depardieu C, Parent C, Crèvecoeur M, Parelle J, Tatin-Froux F, Le Provost G, Capelli N. 2012.** Identification and expression of nine oak aquaporin genes in the primary root axis of two oak species, *Quercus petraea* and *Quercus robur*. *PloS one* **7**: e51838.
- Reinders A, Schulze W, Kühn C, Barker L, Schulz A, Ward JM, Frommer WB. 2002.** Protein-protein interactions between sucrose transporters of different affinities colocalized in the same enucleate sieve element. *The Plant Cell* **14**: 1567–1577.
- Reinders A, Sivitz AB, Starker CG, Gantt JS, Ward JM. 2008.** Functional analysis of LjSUT4, a vacuolar sucrose transporter from *Lotus japonicus*. *Plant molecular biology* **68**: 289–299.

- Reinders A, Sivitz AB, Ward JM. 2012.** Evolution of plant sucrose uptake transporters. *Frontiers in plant science* **3**: 22.
- Rengel Z, Cakmak I, White PJ. 2021.** *Marschner's mineral nutrition of higher plants*, 4th ed. [Place of publication not identified]: ELSEVIER ACADEMIC Press.
- Rennie EA, Turgeon R. 2009.** A comprehensive picture of phloem loading strategies. *PNAS* **106**: 14162–14167.
- 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.
- Rottmann TM, Fritz C, Lauter A, Schneider S, Fischer C, Danzberger N, Dietrich P, Sauer N, Stadler R. 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.
- Ruehr NK, Offermann CA, Gessler A, Winkler JB, Ferrio JP, Buchmann N, Barnard RL. 2009.** Drought effects on allocation of recent carbon: from beech leaves to soil CO<sub>2</sub> efflux. *New Phytol* **184**: 950–961.
- Sakr S, Noubahni M, Bourbouloux A, Riesmeier J, Frommer WB, Sauer N, Delrot S. 1997.** Cloning, ageing and expression of plant membrane transporters. *Biochimica et Biophysica Acta* **1330**: 207–216.
- Sala A, Piper F, Hoch G. 2010.** Physiological mechanisms of drought-induced tree mortality are far from being resolved. *New Phytol* **186**: 274–281.
- Salmon Y, Dietrich L, Sevanto S, Hölttä T, Dannoura M, Epron D. 2019.** Drought impacts on tree phloem: from cell-level responses to ecological significance. *Tree physiology* **39**: 173–191.
- Santos EF, Mateus NS, Rosário MO, Garcez TB, Mazzafera P, Lavres J. 2021.** Enhancing potassium content in leaves and stems improves drought tolerance of eucalyptus clones. *Physiol Plant* **172**: 552–563.
- Sauer N. 2007.** Molecular physiology of higher plant sucrose transporters. *FEBS letters* **581**: 2309–2317.
- Sauer N, Ludwig A, Knoblauch A, Rothe P, Gahrz M, Klebl F. 2004.** AtSUC8 and AtSUC9 encode functional sucrose transporters, but the closely related AtSUC6 and

- AtSUC7 genes encode aberrant proteins in different Arabidopsis ecotypes. *The Plant journal for cell and molecular biology* **40**: 120–130.
- Sauer N, Stolz J. 1994.** SUC1 and SUC2: two sucrose transporters from Arabidopsis thaliana; expression and characterization in baker's yeast and identification of the histidine-tagged protein. *The Plant Journal* **6**: 67–77.
- Schippers JHM, Schmidt R, Wagstaff C, Jing H-C. 2015.** Living to Die and Dying to Live: The Survival Strategy behind Leaf Senescence. *Plant Physiol* **169**: 914–930.
- Schneider S, Hulpke S, Schulz A, Yaron I, Höll J, Imlau A, Schmitt B, Batz S, Wolf S, Hedrich R, Sauer N. 2012.** Vacuoles release sucrose via tonoplast-localised SUC4-type transporters. *Plant biology (Stuttgart, Germany)* **14**: 325–336.
- Schulz A. 1992.** Living sieve cells of conifers as visualized by confocal, laser-scanning fluorescence microscopy. *Protoplasma* **166**: 153–164.
- Schulz A, Beyhl D, Marten I, Wormit A, Neuhaus E, Poschet G, Büttner M, Schneider S, Sauer N, Hedrich R. 2011.** Proton-driven sucrose symport and antiport are provided by the vacuolar transporters SUC4 and TMT1/2. *The Plant journal for cell and molecular biology* **68**: 129–136.
- Serrano R, Kielland-Brandt MC, Fink GR. 1986.** Yeast plasma membrane ATPase is essential for growth and has homology with (Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>), K<sup>+</sup>- and Ca<sup>2+</sup>-ATPases. *Nature* **319**: 689–693.
- Sevanto S. 2014.** Phloem transport and drought. *Journal of experimental botany* **65**: 1751–1759.
- Sevanto S. 2018.** Drought impacts on phloem transport. *Current opinion in plant biology* **43**: 76–81.
- Shabala SN, Lew RR. 2002.** Turgor regulation in osmotically stressed Arabidopsis epidermal root cells. Direct support for the role of inorganic ion uptake as revealed by concurrent flux and cell turgor measurements. *Plant physiology* **129**: 290–299.
- Sivitz AB, Reinders A, Ward JM. 2008.** Arabidopsis sucrose transporter AtSUC1 is important for pollen germination and sucrose-induced anthocyanin accumulation. *Plant physiology* **147**: 92–100.
- Slewiniski TL, Zhang C, Turgeon R. 2013.** Structural and functional heterogeneity in phloem loading and transport. *Frontiers in plant science* **4**: 244.
- Smirnoff N. 1993.** The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytol* **125**: 27–58.

- Smith AM, Stitt M. 2007.** Coordination of carbon supply and plant growth. *Plant, cell & environment* **30**: 1126–1149.
- Snegireva AV, Ageeva MV, Amenitskii SI, Chernova TE, Ebskamp M, Gorshkova TA. 2010.** Intrusive growth of sclerenchyma fibers. *Russ J Plant Physiol* **57**: 342–355.
- Soar I. 1922.** The structure and function of the endodermis in the leaves of the abietinae. *New Phytol* **21**: 269–292.
- Srivastava AC, Ganesan S, Ismail IO, Ayre BG. 2008.** Functional characterization of the Arabidopsis AtSUC2 Sucrose/H<sup>+</sup> symporter by tissue-specific complementation reveals an essential role in phloem loading but not in long-distance transport. *Plant physiology* **148**: 200–211.
- Stadler R, 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.
- Stanfield RC, Bartlett MK. 2022.** Coordination Between Phloem Loading and Structure Maintains Carbon Transport Under Drought. *Frontiers in plant science* **13**: 787837.
- Stitt M, Heldt H-W. 1981.** Physiological Rates of Starch Breakdown in Isolated Intact Spinach Chloroplasts. *Plant Physiol.* **68**: 755–761.
- Stival Sena J, Giguère I, Boyle B, Rigault P, Birol I, Zuccolo A, Ritland K, Ritland C, Bohlmann J, Jones S, Bousquet J, Mackay J. 2014.** Evolution of gene structure in the conifer *Picea glauca*: a comparative analysis of the impact of intron size. *BMC plant biology* **14**: 95.
- Stolz J, Ludwig A, Stadler R, Biesgen C, Hagemann K, Sauer N. 1999.** Structural analysis of a plant sucrose carrier using monoclonal antibodies and bacteriophage lambda surface display. *FEBS letters* **453**: 375–379.
- Tamura K, Stecher G, Kumar S. 2021.** MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular biology and evolution* **38**: 3022–3027.
- Tang C, Huang D, Yang J, Liu S, Sakr S, Li H, Zhou Y, Qin Y. 2010.** The sucrose transporter HbSUT3 plays an active role in sucrose loading to laticifer and rubber productivity in exploited trees of *Hevea brasiliensis* (para rubber tree). *Plant, cell & environment* **33**: 1708–1720.

- Tardieu F, Simonneau T. 1998.** Variability among species of stomatal control under fluctuating soil water status and evaporative demand: modelling isohydric and anisohydric behaviours. *J Exp Bot* **49**: 419–432.
- Thompson MV, Holbrook NM. 2003.** Scaling phloem transport: water potential equilibrium and osmoregulatory flow. *Plant Cell Environ* **26**: 1561–1577.
- Thompson MV, Zwieniecki MA. 2008.** The Role of Potassium in Long Distance Transport in Plants. In: Holbrook NM, Zwieniecki MA, eds. *Vascular transport in plants*. Amsterdam [etc.]: Elsevier, 221–240.
- Turgeon R. 1991.** Symplastic phloem loading and the sink-source transition in leaves a model. *Recent advances in phloem transport and assimilate compartmentation*: 18–22.
- Turgeon R. 1996.** Phloem loading and plasmodesmata. *Trends in Plant Science* **1**: 418–423.
- Turgeon R, Beebe D, Gowan E. 1993.** The intermediary cell: Minor-vein anatomy and raffinose oligosaccharide synthesis in the Scrophulariaceae. *Planta* **191**.
- Turgeon R, Beebe DU. 1991.** The Evidence for Symplastic Phloem Loading. *Plant Physiol.* **96**: 349–354.
- Turgeon R, Medville R. 1998.** The absence of phloem loading in willow leaves. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 12055–12060.
- Turgeon R, Medville R. 2004.** Phloem loading. A reevaluation of the relationship between plasmodesmatal frequencies and loading strategies. *Plant physiology* **136**: 3795–3803.
- van Bel AJ. 1996.** Interaction between sieve element and companion cell and the consequences for photoassimilate distribution. Two structural hardware frames with associated physiological software packages in dicotyledons? *Journal of experimental botany* **47 Spec No**: 1129–1140.
- van Bel AJE. 2003a.** The phloem, a miracle of ingenuity. *Plant, cell & environment* **26**: 125–149.
- van Bel AJE. 2003b.** Transport Phloem: Low Profile, High Impact. *Plant physiology* **131**: 1509–1510.
- van Bel AJE, Ammerlaan A, van Dijk AA. 1993.** A three-step screening procedure to identify the mode of phloem loading in intact leaves. *Planta* **1994**: 31–39.
- van Bel AJE, Knoblauch M. 2000.** Sieve element and companion cell: the story of the comatose patient and the hyperactive nurse. *Functional Plant Biol.* **27**: 477.

- Voitsekhovskaja OV, Koroleva OA, Batashev DR, Knop C, Tomos AD, Gamalei YV, Heldt H-W, Lohaus G. 2006.** Phloem loading in two Scrophulariaceae species. What can drive symplastic flow via plasmodesmata? *Plant physiology* **140**: 383–395.
- Wang M, Zheng Q, Shen Q, Guo S. 2013.** The critical role of potassium in plant stress response. *International journal of molecular sciences* **14**: 7370–7390.
- Ward JM, Kühn C, Tegeder M, Frommer WB. 1998.** Sucrose Transport in Higher Plants. *International Review of Cytology* **178**: 41–71.
- Weschke W, Panitz R, Sauer N, Wang Q, Neubohn B, Weber H, Wobus U. 2000.** Sucrose transport into barley seeds: molecular characterization of two transporters and implications for seed development and starch accumulation. *The Plant journal for cell and molecular biology* **21**: 455–467.
- Williams LE, Lemoine R, Sauer N. 2000.** Sugar transporters in higher plants - a diversity of roles and complex regulation. *Trends in Plant Science*: 1360–1385.
- Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP. 1997.** Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *BioTechniques* **22**: 130-1, 134-8.
- Wolfenstetter S.** Analysen zur subzellulären Verteilung von Zucker- und Zuckeralkoholtransportern in *Arabidopsis thaliana*. *Dissertation*, in press.
- Woodruff DR. 2014.** The impacts of water stress on phloem transport in Douglas-fir trees. *Tree physiology* **34**: 5–14.
- Xu Q, Chen S, Yunjuan R, Chen S, Liesche J. 2018.** Regulation of Sucrose Transporters and Phloem Loading in Response to Environmental Cues. *Plant physiology* **176**: 930–945.
- Xu Q, Yin S, Ma Y, Song M, Song Y, Mu S, Li Y, Liu X, Ren Y, Gao C, Chen S, Liesche J. 2020.** Carbon export from leaves is controlled via ubiquitination and phosphorylation of sucrose transporter SUC2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **117**: 6223–6230.
- Xue L-J, Frost CJ, Tsai C-J, Harding SA. 2016.** Drought response transcriptomes are altered in poplar with reduced tonoplast sucrose transporter expression. *Scientific reports* **6**: 33655.
- Yamada K, Osakabe Y, Mizoi J, Nakashima K, Fujita Y, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. 2010.** Functional analysis of an *Arabidopsis thaliana* abiotic stress-inducible facilitated diffusion transporter for monosaccharides. *The Journal of biological chemistry* **285**: 1138–1146.

- Yang X, Lu M, Wang Y, Wang Y, Liu Z, Chen S. 2021.** Response Mechanism of Plants to Drought Stress. *Horticulturae* **7**: 50.
- Zang C, Pretzsch H, Rothe A. 2012.** Size-dependent responses to summer drought in Scots pine, Norway spruce and common oak. *Trees* **26**: 557–569.
- Zang C, Rothe A, Weis W, Pretzsch H. 2011.** Zur Baumarteneignung bei Klimawandel: Ableitung der Trockenstress-Anfälligkeit wichtiger Waldbaumarten aus Jahrringbreiten. *Allgemeine Forst- und Jagdzeitung* **182**: 98–112.
- Zhang C, Turgeon R. 2018.** Mechanisms of phloem loading. *Current opinion in plant biology* **43**: 71–75.
- Zhang WY, Xu YC, Li WL, Yang L, Yue X, Zhang XS, Zhao XY. 2014.** Transcriptional analyses of natural leaf senescence in maize. *PloS one* **9**: e115617.
- Zimin A, Stevens KA, Crepeau MW, Holtz-Morris A, Koriabine M, Marçais G, Puiu D, Roberts M, Wegrzyn JL, Jong PJ de, Neale DB, Salzberg SL, et al. 2014.** Sequencing and assembly of the 22-gb loblolly pine genome. *Genetics* **196**: 875–890.
- Zimmermann MH, Ziegler H. 1975.** *List of sugars and sugar alcohols in sieve-tube exudates*. Berlin: Springer.
- Zrenner R, Stitt M. 1991.** Comparison of the effect of rapidly and gradually developing water-stress on carbohydrate metabolism in spinach leaves. *Plant Cell Environ* **14**: 939–946.

## Anhang

### Abkürzungsverzeichnis

Die Bezeichnungen chemischer Verbindungen erfolgten nach ihrer Benennung im Periodensystem. Für physikalische Größen und ihre Einheiten wurde das international gültige SI-Einheitensystem verwendet.

Amp	Ampicillin
ATP	Adenosintriphosphat
AS	Aminosäure
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-indoylphosphat 4-Toluidinsalz
Bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>bovine serum albumine</i> )
cDNA	komplementäre DNA ( <i>complementary DNA</i> )
C <sub>t</sub>	Schwellenwert-Zyklus ( <i>cycle threshold</i> )
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dH <sub>2</sub> O	Reinstwasser
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphate
DW	Trockengewicht ( <i>dry weight</i> )
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenbis(oxyethylennitrilo)tetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
<i>et al.</i>	und andere ( <i>et alii</i> )
g	Erdbeschleunigung
gDNA	genomische DNA
GFP	Grün fluoreszierendes Protein ( <i>green fluorescent protein</i> )
GOI	Zielgen ( <i>gene of interest</i> )
GPH	glycosid-pentosid-hexuronid
HCl	Salzsäure
HKG	Haushaltsgen ( <i>housekeeping gene</i> )
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
MCS	Multiple Klonierungsstelle ( <i>multiple cloning site</i> )
MFS	<i>major facilitator superfamily</i>
n	Anzahl
NADP	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
ORF	offener Leserahmen ( <i>open reading frame</i> )
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung ( <i>phosphate-buffered saline</i> )
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H <sup>+</sup> -Ionen-Aktivität
RACE	<i>Rapid Amplification of cDNA-Ends</i>
RG	Reaktionsgefäß
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>revolutions per minute</i> )
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung ( <i>standard deviation</i> )
SDS	Natriumdodecylsulfat
SUC	Saccharosetransporter ( <i>sucrose uptake carrier</i> )
SUT	Saccharosetransporter ( <i>sucrose uptake transporter</i> )
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

tRNA	Transfer-RNA
U	Unit (Enzymeinheit) [ $\mu\text{mol Substrat}/\text{min}$ ]
UTR	Untranslatierte Region ( <i>untranslated region</i> )
v/v	Volumen pro Gesamtvolumen ( <i>volume per volume</i> )
w/v	Gewicht pro Gesamtvolumen ( <i>weight per volume</i> )
w/w	Gewicht pro Gesamtgewicht ( <i>weight per weight</i> )
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid
ü. N.	über Nacht

## Verwendete Chemikalien

2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure (MES)	Roth
5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (X-Gal)	Roth
5-Bromo-4-Chloro-3-indoylphosphat 4-Toluidinsalz (BCIP)	Roth
Adenosin-5'-triphosphat (ATP) Dinatriumsalz	Roth
Agar-Agar	Roth
Agarose	Roth
Ampicillin	Roth
Anti-Digoxigenin (DIG)-Antikörper	Roche
Biotin	Roth
Block-Reagenz	Roche
Calciumchlorid ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ )	Roth
Calciumpantothenat	Roth
Carbenicillin	Roth
Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB)	Roth
Chloroform	VWR
Denhardt's Lösung	Sigma
Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs)	Bio&Sell, Roth
Dextransulfat 500 Natriumsalz	Roth
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Roth
Digoxigenin(DIG) 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
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth
Eosin G	Roth
Entellan	Merck
Essigsäure	Roth
Essigsäure-Anhydrid	Merck
Ethanol	VWR, Chemsolute, Fisher Chemical
Ethidumbromid	Roth
Ethylenbis(oxyethylenitrilo)tetraessigsäure (EGTA)	Roth
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth
Formaldehyd	Roth
Formamid, deionisiert	Roth
D(+)-Fructose	Roth
Gamborg B5 Salze	Duchefa
Gamborg B5 Vitamin Mix	Duchefa
Glutaraldehyd	Roth
Glycerol	Roth
Glycin	Roth
D(+)-Glucose	Roth
Hefeextrakt	Roth
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
$\beta$ -Mercaptoethanol	Merck
Methanol	Roth
N,N'-Dimethylformamid (DMF)	Roth
Natriumacetat	Merck
Natriumcarbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )	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 ( $\text{NaHCO}_3$ )	Roth
Natriumhydroxid (NaOH)	Grüssing
Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADP)	Roth
Dinatriumsalz	
Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT)	Roth
Paraformaldehyd	Roth
Paraplast	Leica
Polyethylenglycol (PEG) <sub>4000</sub>	Roth
Polyvinylpyrrolidon (PVP)	Fluka
Rinderserumalbumin (BSA)	Roth
RNase AWAY	Roth
Rubidiumchlorid (RnCl)	Roth
D(+)-Saccharose	Roth
Salzsäure (HCl)	VWR
Schwefelsäure ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ )	Roth
Triethanolamin	Roth
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Roth
Triton X-100	Roth
tRNA	Roche
Trypton	Roth
Tween 20	Roth
Xylol	Roth

## Verwendete Laborgeräte

Autoklav	H+P Labortechnik
Binokular	Zeiss
Brutschrank	Labwit
Elektrophoresekammer	Polymehr
Fluoreszenzmikroskop	Leica
Gefrierschrank	Privileg
Gefriertruhe -80°C	FRYKA
Geldokumentation	INTAS UV-Systeme
Gewebeinfiltrationsautomat	Leica
Heizblock	Roth
HPLC	Dionex, Thermo Fisher Scientific
Horizontalschüttler	VWR
Hybridisierungssofen	Appligene
Kugelmühle	Retsch
Kühlschrank	Privileg
Lyophylle	Christ
Magnetrührgeräte	Phoenix Instruments
Mikroliterpipetten	VWR
Mikroskope	Zeiss
Mikrotom	Leica
Minizentrifuge	VWR
Nano-drop lite	Thermo Scientific
pH-Meter	Mettler Toledo

Photometer	Thermo Scientific
Präzisionswaage	Ohaus Corporation
qPCR-System	Agilent
Rotationsverdampfer	VWR
Schüttelinkubator	VWR
Spannungsgeber	Consort
Speed-Vac	Eppendorf
Sterilwerkbank	Thermo Scientific
Thermocycler	Eppendorf
Thermo-Schüttler	Biometra, Grant-Bio
Tischwaage	Ohaus Corporation
Trockenbank für Objektträger	Electrothermal
Trockenschränke	Binder, Heraeus
UV-Transilluminator	Biometra
Vortex Schüttler	VWR
Wasserbad	VWR
Zentrifugen	
Biofuge pico	Hereaus
Centrifuge 5424	Eppendorf
Centrifuge 5804R	Eppendorf
Micro Star 17	VWR
Micro Star 17R	VWR
Mikro 200R	Hettich
Rotoren	
2427-A	Eppendorf
A-4-44	Eppendorf
FA-45-24-11	Eppendorf

### Webadressen der verwendeten Software (Anhang zu Kapitel 2.1.8)

Name	Webadresse
<b>Bioedit</b>	<a href="http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html">http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html</a>
<b>BLAST</b>	<a href="http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
<b>Chromas Pro</b>	<a href="http://technelysium.com.au/">http://technelysium.com.au/</a>
<b>Chromeleon</b>	<a href="https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/CHROMELEON7">https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/CHROMELEON7</a>
<b>Expasy Translate</b>	<a href="https://web.expasy.org/translate/">https://web.expasy.org/translate/</a>
<b>LAS X</b>	<a href="https://www.leica-microsystems.com/de/produkte/mikroskop-software/p/leica-las-x-ls/">https://www.leica-microsystems.com/de/produkte/mikroskop-software/p/leica-las-x-ls/</a>
<b>MatGAT</b>	<a href="https://bmcbioinformatics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2105-4-29">https://bmcbioinformatics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2105-4-29</a>
<b>MEGA11</b>	<a href="https://www.megasoftware.net/">https://www.megasoftware.net/</a>
<b>MxPro</b>	<a href="https://www.agilent.com/">https://www.agilent.com/</a>
<b>NCBI</b>	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/</a>
<b>PerlPrimer</b>	<a href="http://perlprimer.sourceforge.net/">http://perlprimer.sourceforge.net/</a>
<b>Primer 3</b>	<a href="https://primer3.ut.ee/">https://primer3.ut.ee/</a>
<b>Protter</b>	<a href="http://wlab.ethz.ch/protter/start/">http://wlab.ethz.ch/protter/start/</a>
<b>TMHMM</b>	<a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/">www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/</a>
<b>Zen</b>	<a href="https://www.zeiss.de/mikroskopie/produkte/mikroskopsoftware/zen.html">https://www.zeiss.de/mikroskopie/produkte/mikroskopsoftware/zen.html</a>

## Verwendete Oligonukleotide für qPCR

Spezies	Name	Sequenz	Referenz
<i>F. sylvatica</i>	FsGAPDH_q_F	CAAGCCTGAGTTCAATGTCCG	
	FsGAPDH_q_R	CTCCAGTCCTTGCTAGATGG	
	FsSUT1_q_F	GTCCAATCTCTGGCATGCTT	(Dobbelstein <i>et al.</i> , 2018)
	FsSUT1_q_R	GGCTTTGTCTAAGCGGTCAC	
	FsSUT2_q_F	CAAAGGAGCATTGCAGTTCA	(Miehe <i>et al.</i> , 2022)
	FsSUT2_q_R	TCCACTAGCACCAGCAGAGA	
	FsSUT4_q_F	CCTCTGCATGCAATGCTAAC	(Dobbelstein <i>et al.</i> , 2018)
	FsSUT4_q_R	CCTGTCCCATCTTCAACAGC	
<i>Q. robur</i>	QrUbi_q_F	CATAGGAAACCAGTTGAGG	(Rasheed-Depardieu <i>et al.</i> , 2012)
	QrUbi_q_R	ACAAGTTTACTGCCACATT	
	QrSUT1_q_F	CGCCGTAGACCCTTTATT	(Öner-Sieben und Lohaus, 2014)
	QrSUT1_q_R	AAAACCCAACCACAAACA	
	QrSUT2_q_F	CTCTTCTGGCCGATCTATC	(Dobbelstein <i>et al.</i> , 2018)
	QrSUT2_q_R	GCAAGCACTACTTGTTCAGG	
	QrSUT4_q_F	TGGAGAAGCTCTGCAGTAAG	(Dobbelstein <i>et al.</i> , 2018)
	QrSUT4_q_R	CATTTGGAGGTAGAGCCTTG	
<i>P. abies</i>	PaEF1a_q_F	AACTGGAGAAGGAACCCAAG	(Bedon <i>et al.</i> , 2007)
	PaEF1a_q_R	AACGACCCAATGGAGGATAC	
	PaSUT1_q_F	AACAACCTGCACTCACTTGGATTG	(Dobbelstein <i>et al.</i> , 2018)
	PaSUT1_q_R	AGTGATCCTGCTCTAACACCTTG	
	PaSUT2_q_F	GATGGGACGGGAAGTATATCAGG	(Dobbelstein <i>et al.</i> , 2018)
	PaSUT2_q_R	GCTGACTCCAAGCACAATAGAG	
<i>P. sylvestris</i>	PsyGAPDH_q_F	CTGGTGTCTTCACCGACAAA	
	PsyGAPDH_q_R	GGTGCTCATTAAACCCCAACA	
	PsySUT1_q_F	AATGAACCCTCGTCTCCTCC	
	PsySUT1_q_R	CAACACTCCCATTGACAGGC	
	PsySUT2_q_F	TCCAAAGATGCAAGACCAAC	
	PsySUT2_q_R	ATGACAACCAACTAAGTGCC	

### Sonstige verwendete Oligonukleotide

Experiment	Name	Sequenz	Referenz
SUT-Screening	ST1f	GCIGCIGGIRTICARTTYGGITGGGC	(Knop <i>et al.</i> , 2001)
	ST1r	GCIACRTCIARDATCCARAAICC	
	ST1lg1r	CCCATCCARTCIGTRTCRWA	(Öner-Sieben und Lohaus, 2014)
	SUT1deg2_F SUT1deg_R	NGGNATHCCNCAYACNTGGGC RAANGGRAACCANGCDATCCAR	
RACE-PCR	Anchor	GACCACGCGTATCGATGTCGAC	
	Oligo dT-Anchor	GACCACGCGTATCGATGTCGACTTTTT TTTTTTTTTTTT	
	PsySUT1_SP6_F	ACTGCACTAACCTGGATCGC	
	PsySUT1_SP5_F	GATCTACCTCGTCCCATGTGG	
Sonden-Synthese	PsyGAPDH_ISH_F	TGATCCGTTTCATTTCCACCG	
	PsyGAPDH_ISH_R	CCGTCTTCTGAGTTGCTGTG	
	PsySUT1_ISH_F	TGTGATGTCAGCTGTTCCAATC	
	PsySUT1_ISH_R	CACGACCCATCCAATCTGTG	
	PsySUT2_ISH_F	GTCAGTGGCATAGATGGTTTCC	
	PsySUT2_ISH_R	TGATATACTTCCCGTCCCATCC	
ORF-Klonierungen	PsySUT1_NotI_F	TAAGCGGCCGCAAGCTTGTA AAAAGAAA TGAATAGAGATCTTCGTACCGGTAGGA G	
	PsySUT1_NotI_R	TAAGCGGCCGCTCAGGGAACAGGAGAA CTTCTT	
	PsySUT2_NotI_F	TAAGCGGCCGCAAGCTTGTA AAAAGAAA TGGCGCCCAAGGAAATTCGTA	
	PsySUT2_NotI_R	TAAGCGGCCGCTCATCCAAAACCGTGG CCC	
	PsySUT1-5'-PciI	TATACATGTGCAATAGAGATCTTCGTA CCG	
	PsySUT1-3'-PciI o. stop	AATACATGTAGGGAACAGGAGAACTTC TTGTTTCGCA	
	PsSUT1-3'-PciI m. stop	AATACATGTTTCAGGGAACAGGAGAACT TCTTGTTTCG	
	PsySUT2-5'-PciI	TATACATGTGCCCCAAGGAAATTCGTA TTCCGTAC	
	PsySUT2-3'-PciI o. stop	TATACATGTGACTGGATCCAAAACCGT GGCCACAG	
	PsSUT2-3'-PciI m. stop	TATACATGTTTCATCCAAAACCGTGGCC CACAGCAG	

## Sequenzen der identifizierten Saccharosetransporter

Name	Sequenz
<i>PsySUT1</i> 1551 bp	<p>ATGAATAGAGATCTTCGTACCGGTAGGAGACCGAAGAGTGAAGTACCTCTGAGAACTTTAGCAAG  AATTACATCAGTGGCCGCAGGAGTGCAGTTTGGATGGGCTTTGCAGTTATCTCTTCTGACACCTT  ATGTGCAGGTCTTGGGGATTTCTCACACATGGGCTAGCTATATATGGCTATGTGGACCCATTTCT  GGCATGTTTGTGCAGCCACTTGTGGGATATTATAGCGATAGATGTGAAAGTCCATGGGGCAGGAG  AAGGCCTTTTCATTTTTATAGGGGCAGTTCATGTGGTGGTGGCAGTTATGCTGATTGGGTTTTAG  CAGACATTGGATATTTGTTTGGGGATTCACTCACGTCCAGGCCAAGGGCTATTGTTATCTTTGTG  TTGGGATTTTGGCTCCTTGATCTGGCCAACAATATGTTACAAGGGCCTTGCAGGGCCCTCCTTGC  AGATTTGTGAGGAAGAAATGAGAGGCGGACAAGAAGTGCCAATGCTTTTTACTCTTTGTTTCATGG  CAGTAGGCAATGTGCTAGGATTTGCAACTGGTTCTTTCAGCAAATGGTACAAAAGTCCCTTCCCTTC  ACAAAACAGAGGCCTGTGATGTCAGCTGTTCCAATCTAAAGTCTGCATTTCTCATAGCAATATT  CATATTGGCAATAACCACCTTCCCTCAGTATAACTGCCACACCTGAGAAAAGATGGTCCACAAGCTG  AATCAGAACCAATTCTGAGAGCTAATGCCTCAGGAGAAAAGATTCATGTTGAAGATGATGATAAT  GAACAGGAAGATGAAGAAATACAAGAAGCATTATCTGGGAGTTATTTAGTGCTTTTCAGGGATCT  ACCTCGTCCCATGTGGTATTTACTTATAACAACCTGCACTAACTTGGATTGCATGGTTTCCCTTTC  TCCTCTTTGACACAGATTGGATGGGTCTGGAAGTTTATAGAGGAGAGCCTGGTGGTCCGGGGCCT  TTCTTTTCTCTATATGAGCGAGGTGTTAGAGCAGGATCACTTGGCCTAATGTTGAATTCATTAAC  ATTGGGGGCAACTTCTCTAATGATAGAGTACCTGTCCCGAAAGTTGGGCCCTAAGTTATTGTTGG  CACTTGCAAACACAATCCTATGCCTTTCACCTGTCATGTACTGTTCTGATCACCAAAGCAGCAGAA  AGTCTTAGCAATGAACCCTCGTCTCCTCCTACGACTCTTAAAATCATGGCTTTGTTAGTTTTTAC  AGTCCTTGGAGCACCTCTTGGCGGTGACATATAGTGTTCATTTGCTTTGACAGCAACTTTTACTTT  CTTCTGCTGGGGGAGGCCAAGGCCTGTCAATGGGAGTGTGAACTTTCAATTGTCATTCCACAG  ATTATTGTATCTGTGGGAAGTGGACCTTGGGATGCACTATTTGGAGGGGGCAATCTCCCTGCTTT  TGTCTTAGGATCTTTCTCTGCATTAGCAGGTGGAATAGCAGCTCTACTATTGCTGCCACACCAC  CTCCTGACTTCCCAGTTCGCGAATACTGCGAACAAGAAGTTCTCCTGTTCCCTGA</p>
<i>PsySUT2</i> 1818bp	<p>ATGGCGCCCAAGGAAATTCGTATTCCGTACAAACATTTGGATCAGGCACAAATTGAATTGTCTGC  GGTTACTGATTCCGGTGAATCGAATTTGAGACCTGAAAATGGAGAAATAGCTGGATCTGGCAATA  ATAATAATAATAATGCTAATAGGAGTAGCTTGCAAACCTTGATTCTTAGTTGTATGATAGCTGCA  GGAGTCCAGTTTGGATGGGGCCTCCAGCTCTCTCTTCTCACGCCCTACATTCAGACACTTGGAAAT  AGAACATGCATTCTCTTCCCTTATTTGGCTTTGTGGTCCAATTACAGGGCTTGTGGTTCAACCCC  TGGTCGGTGTCTGGAGTGACAAGTGCCATTCCAAATATGGAAGAAGGGCTCCTTTTATCTTGA  GGGTCTATCTTGATTTGTTTTGCAGTGACAGTTATAGGATTTTCTGCAGATATTGGTTACCTTTT  TGGGGATACACATGAGCATTGCAAGACATATCGAGGTACAAGGCCCTGGGCTGCTGCAGTCTTTG  TAATAGGATTTTGGATGCTTGATCTTGGCAACAACGCAAGTCCAGCTGCAAGTCCAGCTGCTCTCT  GCTGATCTTTTCCAGTCCAGATCAACGAGATTGCAAAATGCTATTTTTTTGTTTCATGGATAGCAGT  TGAAATATTTTTAGGGTTTTTCCAGCTGGTGAAGCGGTGAGTGGCATAGATGGTTTCCATTTCTTA  CCACCAAAGCATGCTGTGAGGCTTGTGGCAACTTGAAAGCAGCTTTTTCTGGTTGCAAGTGGTCTTT  CTTTTGATATGTACAGCTATCACCATCTACTTTGCTCCGGAGATCCCATATCCACAAAATCAAT  ACCGCAGGCTGGTGACATGGCCCTTTGTTACATATTCAAGAGAATCAATCGAGGGATTCAAAAA  GTCATAATATGAAACCAGAGGGGATTTGTGCGGATGGATATAACGTGCAGTCTCCACATCAAAAT  GCCAGTGTAGTAGTTTCACTCTCCACATCAAAATGCCAGTGTAGTAGTTTCACTCTCCAAAGATGCA  AGACCAACATGAAAGCTTTAATGATGGACCTGGGGCTGTATTAGTCAACCTTTTACAAGCATGA  GGCATCTTCCACCTGCAATGAAATCTGTTCTTTTAGTAATGGCACTTAGTTGGTTGTCATGGTTT  CCATTCTTCTCTTTGATACGGATTGGATGGGACGGGAAGTATATCAGGGGGACCCCAATGCAAA  GGGCACAACAGCTGATGCTTATCATAAAGGTGTTCAAGAAGGATCATTTGGATTGCTGTTAAACT  CTATTGTGCTTGGGGTCACTCTCTTTTTCATTGAACCCTTATGTCGTTGGATGGGAACAAAAACT  TTATGGGCTACAAGCAATTTTATTGTGTTTGCCTGCATGGCAAGTACAGCAATCATAAGTGTCTG  TGCTTTGAGTGAGCATCACAGAGGAATTCATATATGATTGGCAATGTTAGCTCAGTCAAAGCTG  CAGCAGTTGTTTTATTTGCCCTTTTAGGGTTTCCATTGGCAATAACATACAGTGTACCTTATTC  GTGACTGCCGAGTTGACTGCAGATGCTGGAGGAGGTTCAAGGTTTGGCTATTGGTGTCTAAACCT  GTCAATTACTGTTCCCTCAGATGATTGTTGCTCTGGAGCTGGTCCATGGGATGCTTTATTTGGAG  GAGGAAACGTACCTGCCTTTGTGTTGGCTTCTGTATTTGCACTTGCAGCTGGAATATTTCAGTG  ACTAGGTTACCCACCTTTCAAGGACTACTTACAAGCCTGCTGTGGGCCACGGTTTTGGATGA</p>

### Liste der für die phylogenetischen Analysen verwendeten Saccharosetransporter

Spezies	Familie	Transporter	Typ	Zugriffsnummer*
<i>Arabidopsis Thaliana</i>	Brassicaceae	AtSUC1	I	AEE35247
		AtSUC2	I	AEC05635
		AtSUC3	II	CAB92307
		AtSUT4	III	AAL59915
<i>Cedrus deodara</i>	Pinaceae	CdSUT1G	I	OL841529
		CdSUT2	II	OL841530
<i>Fagus sylvatica</i>	Fagaceae	FsSUT1	I	MH650992
		FsSUT2	II	OP038564
		FsSUT4	III	OP038565
<i>Fraxinus excelsior</i>	Oleaceae	FeSUT1	I	AHB33870
<i>Ginkgo biloba</i>	Ginkgoaceae	GbSUT1	I	MH650993
		GbSUT2	II	MH650994
		GbSUT4	III	MH650995
<i>Juglans regia</i>	Juglandaceae	JrSUT1	I	AAU11810
<i>Oryza sativa</i>	Poaceae	OsSUT1	IIB	BAA24071
<i>Physcomitrella patens</i>	Funariaceae	PpSUT2	II	18051919**
		PpSUT4	III	18040351**
<i>Picea abies</i>	Pinaceae	PaSUT1	I	MH281472
		PaSUT2	II	MH281473
<i>Pinus massoniana</i>	Pinaceae	PmaSUT1G	I	OL841531
		PmaSUT2	II	OL841532
<i>Pinus sylvestris</i>	Pinaceae	PsySUT1	I	-
		PsySUT2	II	-
<i>Populus tremula x alba</i>	Salicaceae	PtaSUT1	I	ADW94615
		PtaSUT4	III	ADW94617
		PtaSUT5	II	ADW94618
<i>Quercus robur</i>	Fagaceae	QrSUT1	I	AHB33871
		QrSUT2	II	MH281474
		QrSUT4	III	MH650991
<i>Selaginella moellendorffii</i>	Selaginellaceae	SmSUT2	II	15412113**
		SmSUT4	III	15419655**
<i>Zea mays</i>	Poaceae	ZmSUT1	IIB	NP_001292720.1
		ZmSUT2	II	NP_001146651
		ZmSUT3	IIB	NP_001141577
		ZmSUT4	III	AAT51689
		ZmSUT5	IIB	NP_001141050

\* Zugriffsnummer für die Datenbank <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

\*\* Zugriffsnummer für die Datenbank <https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mich während meiner Dissertation begleitet und unterstützt haben.

Ein großer Dank geht dabei an Frau Prof'in Dr. Gertrud Lohaus, für die Möglichkeit in ein interessantes und anspruchsvolles Thema einzutauchen und meine Promotion in deiner Arbeitsgruppe zu absolvieren. Ich danke dir für die wissenschaftliche Anleitung, die motivierende Betreuung und die persönliche Unterstützung, die ich von dir erfahren durfte.

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

Einen besonderen Dank möchte ich an die Arbeitsgruppe Botanik richten. Ich danke euch für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die zahlreichen wissenschaftlichen und persönlichen Gespräche. An Elena und Daniel für meine Einarbeitung, die Unterstützung im Labor und das Philosophieren rund um unser Baum-Thema. An Wiebke für alle fachlichen und privaten Ratschläge, für die musikalische Inspiration im Labor, die gemeinschaftliche kreative Gestaltung der Büroräumlichkeiten und natürlich für jede Latte Macchiato-Pause. An Thomas für deine endlose Geduld bei allen Fragen, insbesondere bezüglich der HPLC, bei der Hilfe mit der statistischen Auswertung und natürlich für die Diskussionen in unserer SUT-Fraktion. An Basel für alle Fragen rund um die HPLC. An Rosi und Antje für die schöne Zeit bei der Betreuung von Formenkenntnis der Pflanze, durch euch wurde meine Liebe zur Pflanzenbestimmung geweckt! An Tim für seine Hilfe bei der Extraktion und der Messung der nie endenden Stärkebestimmungen. An Anja für jeden wunderbaren Kuchen! An Ralf für die zahlreichen Reparaturen und die Einweisung in die Wartung der Laborgeräte.

Zusätzlich danke ich den Mitgliedern der Arbeitsgruppen Zoologie, Mikrobiologie und Lebensmittelchemie bzw. der AG Bornhorst für die Hilfsbereitschaft und die Bereitstellung der Labore und Geräte.

Ich bedanke mich bei Herrn Dr. Franz Klebl und Frau PD Dr. Ruth Stadler von der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg für die Übernahme der heterologen Expression und der Bereitstellung der Expressionsvektoren.

Vielen Dank richte ich auch an Herrn Prof. Dr. Thomas Stützel von der Ruhr-Universität Bochum und seiner Arbeitsgruppe für die Hilfe und die Zeit bei der Identifikation von Gewebetypen in meinen *in-situ* Präparaten vor Ort und der freundlichen Korrespondenz.

Ich danke Gwen für die Unterstützung und die Ratschläge bezüglich der *in-situ* Hybridierung und natürlich auch für unsere nicht-fachlichen Gespräche.

Ferner möchte ich Thomas, Wiebke, Eva und Tobi für das Korrekturlesen und die hilfreichen Kommentare danken.

Zum Schluss möchte ich mich bei meinen Eltern und meinem Partner bedanken. Für euer Interesse an meiner Arbeit, eurem Zuspruch und der Ermutigung, niemals das Ziel aus den Augen zu verlieren.

## Erklärung

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

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

---

Laura Czempik

(Wuppertal, im Juli 2023)