

# Phloembeladung und Zuckertransport in ausgewählten Gymnospermen

## Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades  
der Fakultät der Mathematik und Naturwissenschaften der  
Bergischen Universität Wuppertal

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

vorgelegt von

**Daniel Fink**

Wuppertal, im Juli 2019

Die Dissertation kann wie folgt zitiert werden:

urn:nbn:de:hbz:468-20190923-134143-6

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=urn%3Anbn%3Ade%3Ahbz%3A468-20190923-134143-6>]

DOI: 10.25926/nm1b-v103

[<https://doi.org/10.25926/nm1b-v103>]

Referentin: Prof'in Dr. Gertrud Lohaus, Bergische Universität Wuppertal  
Co-Referentin: Prof'in Dr. Gela Preisfeld, Bergische Universität Wuppertal

*"In the end, everything will be ok. If it's not ok, it's not yet the end."*

Fernando Sabino

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>IV</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>V</b>
<b>Zusammenfassung</b>	<b>VI</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Gymnospermen .....	1
1.1.1 Phylogenie .....	2
1.1.2 Blattanatomie .....	3
1.1.3 Phloem – Aufbau und Transport .....	5
1.2 Saccharose-Transporter – Struktur und Funktion.....	6
1.3 Mechanismen der Phloembeladung.....	9
1.3.1 Apoplastische-Beladung.....	10
1.3.2 Symplastische-Beladung .....	10
1.3.3 Passive-Beladung .....	11
1.4 Fragestellungen .....	12
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>13</b>
2.1 Material .....	13
2.1.1 Chemikalien und Geräte.....	13
2.1.2 Pflanzen.....	13
2.1.3 Bakterienstämme .....	13
2.1.4 Plasmide .....	14
2.1.5 Enzyme.....	14
2.1.6 Größenstandards.....	14
2.1.7 Kits .....	14
2.1.8 Oligonukleotide .....	15
2.2 Elektronenmikroskopie (TEM) .....	15
2.3 Extraktion von Metaboliten aus Pflanzengewebe .....	15
2.3.1 Zuckerextraktion .....	16
2.3.2 Stärkegewinnung.....	16
2.3.3 Gewinnung von Phloemsaft .....	16
2.3.4 Gewinnung von Blatt-Exsudaten.....	17
2.4 Biochemische Methoden .....	17
2.4.1 Nicht-wässrige Fraktionierung (NWF).....	17
2.4.2 Proteinextraktion .....	18
2.4.3 Proteinbestimmung.....	18

2.4.4	UDP-Glukose-Assay .....	19
2.4.5	$\alpha$ -Mannosidase-Assay .....	19
2.4.6	Chlorophyllbestimmung .....	20
2.4.7	Zuckeranalyse.....	20
2.4.8	Stärkebestimmung .....	20
2.4.9	PCMBS-Assay .....	21
2.5	Mikrobiologische Methoden .....	21
2.5.1	Steriles Arbeiten.....	21
2.5.2	<i>E. coli</i> – Anzucht und Lagerung.....	21
2.6	Molekularbiologische Methoden.....	22
2.6.1	RNA-Isolierung.....	22
2.6.2	DNA-Isolierung.....	25
2.6.3	cDNA-Synthese.....	25
2.6.4	Primerdesign.....	26
2.6.5	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	26
2.6.6	Rapid Amplification of cDNA-Ends (RACE).....	27
2.6.7	Quantitative Echtzeit-PCR (qPCR).....	28
2.6.8	Herstellung und Transformation chemisch-kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen .....	29
2.6.9	Klonierungsstrategien.....	30
2.6.10	Gelelektrophorese.....	31
2.6.11	<i>in-situ</i> -Hybridisierung .....	32
2.7	Verwendete Software .....	36
2.8	Statistische Analyse.....	37
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>38</b>
3.1	<i>Minor vein</i> - und Leitbündel-Anatomie.....	38
3.1.1	<i>Picea abies</i> .....	38
3.1.2	<i>Ginkgo biloba</i> .....	38
3.1.3	<i>Gnetum gnemon</i> .....	40
3.1.4	<i>Magnolia kobus</i> .....	41
3.2	Subzelluläre Verteilung der Zucker .....	42
3.2.1	Subzelluläre Zuckerverteilung in <i>Gnetum gnemon</i> und <i>Magnolia kobus</i> .....	42
3.2.2	Subzelluläre Volumina .....	42
3.2.3	Subzelluläre Zuckerkonzentrationen .....	44
3.2.4	Saccharose-Gradient zwischen Phloem und Cytosol in <i>M. kobus</i> .....	44
3.3	Identifizierte Saccharose-Transporter-Sequenzen.....	45
3.3.1	Phylogenetische Analyse.....	46

3.3.2	Funktions-Charakterisierung .....	48
3.4	Lokalisation von <i>PaSUT1</i> und <i>PaSUT2</i> .....	48
3.5	Jahreszeitliche Änderung des NSC-Gehalts und der SUT-Expression .....	49
3.5.1	<i>Picea abies</i> .....	49
3.5.2	<i>Ginkgo biloba</i> .....	51
3.5.3	<i>Gnetum gnemon</i> .....	53
3.5.4	<i>Magnolia kobus</i> .....	54
3.6	Einfluss von Licht auf den NSC-Gehalt und SUT-Expression .....	56
3.6.1	<i>Picea abies</i> .....	56
3.6.2	<i>Ginkgo biloba</i> .....	57
3.6.3	<i>Magnolia kobus</i> .....	59
3.7	Effekt von PCMBS auf den Zuckergehalt in Blatt-Exsudaten .....	60
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>61</b>
4.1	Anwendbarkeit der Kriterien zur Bestimmung des Phloembeladungs-Mechanismus bei Bäumen .....	61
4.2	Saccharose-Transporter in Gymnospermen .....	63
4.2.1	Funktions-Charakterisierung – ein <i>targeting</i> -Problem .....	64
4.2.2	Kein Typ III-SUT in Koniferen? .....	65
4.2.3	<i>PaSUT1</i> – Lokalisation im Tonoplasten .....	65
4.3	Mögliche Beteiligung von <i>PaSUT1</i> und <i>PaSUT2</i> am <i>pre-phloem-pathway</i> .....	67
4.4	SUT – Expression, Funktionen und Regulation .....	68
4.4.1	Gewebespezifische SUT-Expression und mögliche Funktionen .....	68
4.4.2	SUT-Expression und NSC-Gehalt .....	70
4.4.3	Einfluss von Licht auf NSC-Gehalt und SUT-Expression .....	73
4.5	Phloembeladung bei Gymnospermen – Fazit und Ausblick .....	75
	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>77</b>
	<b>Appendix</b> .....	<b>90</b>
	Abkürzungsverzeichnis .....	90
	Verwendete Chemikalien .....	92
	Verwendete Laborgeräte .....	93
	Verwendete Oligonukleotide .....	94
	Puffer und Lösungen für die <i>in-situ</i> Hybridisierung .....	96
	Sequenzen der EST zusätzlich identifizierter SUT .....	97
	Liste der für die phylogenetischen Analysen verwendeten Saccharose-Transporter .....	98
	<b>Danksagungen</b> .....	<b>99</b>
	<b>Erklärung</b> .....	<b>100</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Hypothesen zur phylogenetischen Stellung der Gnetophyta innerhalb der Samnepflanzen .....	2
Abbildung 1.2: Anordnung der verschiedenen Gewebetypen und Transportwege in Gymnospermen-Blättern .....	4
Abbildung 1.3: Vereinfachte Darstellung der einzelnen Abschnitte des Phloems .....	5
Abbildung 1.4: Grundstruktur eines Saccharose-Transporters .....	7
Abbildung 1.5: Stammbaum von Saccharose-Transportern aus 41 sequenzierten Pflanzengenomen ....	8
Abbildung 1.6: Übersicht der verschiedenen <i>minor vein</i> Typen .....	9
Abbildung 1.7: Apoplastische Phloembeladung .....	10
Abbildung 1.8: Symplastische Phloembeladung ( <i>polymer-trap</i> ) .....	10
Abbildung 1.9: Passive Phloembeladung .....	11
Abbildung 2.1: Schematische Übersicht über die experimentelle Abfolge .....	16
Abbildung 2.2: Schematischer Ablauf eines RACE-Experiments .....	27
Abbildung 3.1: TEM-Aufnahmen des Leitbündels von <i>P. abies</i> .....	38
Abbildung 3.2: TEM-Aufnahmen der <i>minor vein</i> von <i>G. biloba</i> .....	39
Abbildung 3.3: TEM-Aufnahmen der <i>minor vein</i> von <i>G. gnemon</i> .....	40
Abbildung 3.4: TEM-Aufnahmen der <i>minor vein</i> von <i>M. kobus</i> .....	41
Abbildung 3.5: Prozentuale Zuckerverteilung in den subzellulären Kompartimenten von <i>M. kobus</i> und <i>G. gnemon</i> .....	42
Abbildung 3.6: Saccharose-Konzentration im Cytosol von Mesophyllzellen und im Phloemsaft in den Blättern von <i>M. kobus</i> .....	44
Abbildung 3.7: Phylogenetische Analyse von Saccharose-Transportern .....	47
Abbildung 3.8: <i>In-situ</i> mRNA-Hybridisierung von <i>PaSUT1</i> und <i>PaSUT2</i> in Leitbündel-Querschnitten der Nadeln von <i>P. abies</i> .....	49
Abbildung 3.9: Veränderung des Zucker- und Stärkegehaltes sowie der SUT-Expression verschiedener Organe von <i>P. abies</i> über den Zeitraum eines Jahres .....	50
Abbildung 3.10: Veränderung des Zucker- und Stärkegehaltes sowie der SUT-Expression verschiedener Organe von <i>G. biloba</i> über den Zeitraum eines Jahres .....	51
Abbildung 3.11: Jahresverlauf der Expression von <i>GbSUT1</i> in <i>sink</i> - und <i>source</i> -Blättern .....	52
Abbildung 3.12: Veränderung des Zucker- und Stärkegehaltes verschiedener Organe von <i>G. gnemon</i> über den Zeitraum eines Jahres .....	53
Abbildung 3.13: Agarosegel zum Nachweis von <i>GgSUT2</i> in verschiedenen Pflanzenorganen .....	54
Abbildung 3.14: Veränderung des Zucker- und Stärkegehaltes sowie der SUT-Expression verschiedener Organe von <i>M. kobus</i> über den Zeitraum eines Jahres .....	55
Abbildung 3.15: Einfluss von Licht und Dauerdunkel auf den Zucker- und Stärkegehalt sowie der SUT- Expression in Nadeln von <i>P. abies</i> .....	57
Abbildung 3.16: Einfluss von Licht und Dauerdunkel auf den Zucker- und Stärkegehalt sowie der SUT- Expression in Blättern von <i>G. biloba</i> .....	58
Abbildung 3.17: Einfluss von Licht und Dauerdunkel auf den Zucker- und Stärkegehalt sowie der SUT- Expression in Blättern von <i>M. kobus</i> .....	59

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Untersuchte Baumarten .....	13
Tabelle 2.2: Verwendete Plasmide .....	14
Tabelle 2.3: Verwendete Enzyme .....	14
Tabelle 2.4: Verwendete Kits .....	14
Tabelle 2.5: Puffer für die Proteinextraktion .....	18
Tabelle 2.6: Zusammensetzung Bradford-Lösung .....	18
Tabelle 2.7: Reaktionslösung für das UDP-Glukose-Assay .....	19
Tabelle 2.8: Puffer und Lösungen für das $\alpha$ -Mannosidase-Assay .....	19
Tabelle 2.9: Einstellungen für die Pulsmessungen am Amperometer .....	20
Tabelle 2.10: Puffer und Lösungen für die Stärkebestimmung .....	21
Tabelle 2.11: Zusammensetzung von Medien zur Anzucht von <i>E. coli</i> (flüssig und fest) .....	22
Tabelle 2.12: Verwendete Medienzusätze und entsprechende Gebrauchskonzentrationen .....	22
Tabelle 2.13: Puffer für die RNA-Isolierung (PINE) .....	23
Tabelle 2.14: Puffer für die RNA-Isolation (Wang) .....	24
Tabelle 2.15: Puffer für die DNA-Isolation .....	25
Tabelle 2.16: Zusammensetzung eines Standard-PCR-Ansatzes .....	26
Tabelle 2.17: Standard-PCR-Programm .....	26
Tabelle 2.18: Zusammensetzung eines Standard-qPCR-Ansatzes .....	29
Tabelle 2.19: Standard qPCR-Programm .....	29
Tabelle 2.20: Primermatrix für die qPCR .....	29
Tabelle 2.21: Puffer für die Herstellung chemisch-kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen .....	30
Tabelle 2.22: Zusammensetzung der Reaktion zum <i>A-tailing</i> von PCR-Ansätzen .....	31
Tabelle 2.23: TAE-Puffer für die Gelelektrophorese .....	31
Tabelle 2.24: Zusammensetzung der RNA-Transkription für die Sondensynthese .....	34
Tabelle 2.25: Verwendete bioinformatische Software und Server .....	36
Tabelle 3.1: Relative Volumina der subzellulären Kompartimente von <i>G. gnemon</i> und <i>M. kobus</i> .....	43
Tabelle 3.2: Trockengewicht, Wassergehalt und Volumina der subzellulären Kompartimente von <i>G. gnemon</i> und <i>M. kobus</i> .....	43
Tabelle 3.3: Zuckerkonzentrationen in Vakuole, Stroma und Cytosol der Blätter von <i>G. gnemon</i> und <i>M. kobus</i> .....	44
Tabelle 3.4: Liste der identifizierten SUT der untersuchten Baumarten .....	45
Tabelle 3.5: Prozentsatz der identischen und ähnlichen Aminosäuren der identifizierten SUT aus <i>P. abies</i> und <i>G. biloba</i> .....	46
Tabelle 3.6: Effekt von PCMBs auf die Exsudation der Zucker von <i>G. gnemon</i> und <i>M. kobus</i> .....	60
Tabelle 4.1: Putative N-terminale Di-Leucin-Sequenz als vakuoläres- <i>targeting</i> -Signal in Typ III-SUT .....	66
Tabelle 4.2: Korrelationskoeffizient nach Pearson zwischen SUT-Expression und dem Saccharose- Gehalt verschiedener Gewebe .....	71

## Zusammenfassung

Für Bäume wird eine passive Phloembeladung angenommen, welche bei den Gymnospermen und basalen Angiospermen als der ursprüngliche Mechanismus angesehen wird. Da in den letzten Jahren immer mehr Saccharose-Transporter in verschiedenen Angiospermen-Baumarten gefunden und mit der Phloembeladung in Verbindung gebracht werden konnten, wurden in dieser Arbeit die Gymnospermen *Picea abies* (H. KAARST), *Ginkgo biloba* (L.) und *Gnetum gnemon* (L.) sowie die basale Angiosperme *Magnolia kobus* (DC.) hinsichtlich ihres Phloembeladungs-Mechanismus und Zuckertransports untersucht.

Es konnten zum ersten Mal Saccharose-Transporter in Gymnospermen identifiziert werden. Dabei handelt es sich um zwei komplette Sequenzen aus dem Nadelbaum *P. abies* (*PaSUT1* und *PaSUT2*) und drei SUT-Sequenzen aus *G. biloba*. Des Weiteren konnten eine partielle Sequenz in der Gymnosperme *G. gnemon* (*GgSUT2*), sowie zwei Teilsequenzen in der basalen Angiosperme *M. kobus* (*MkSUT2* und *MkSUT4*) gefunden werden. Mittels quantitativer Echtzeit-PCR wurde die Expression der Transporter im Jahresverlauf und in Licht/Dunkel Verhältnissen untersucht. Es zeigte sich, dass alle Transporter in allen Geweben und zu jeder Jahreszeit unterschiedlich stark exprimiert wurden. Die Ergebnisse des Licht/Dunkel-Experimentes zeigten, dass die Expression der Transporter sowohl diurnal, als auch circadian vom Licht beeinflusst wird. Gleichzeitig wurde der Zucker- und Stärkegehalt (*non structural carbohydrates*, NSC) der Gewebe bestimmt um Einblicke in das Zusammenspiel zwischen SUT-Expression und NSC zu gewinnen. Neben der Expression konnten beide SUT von *P. abies* in der Nadel durch *in-situ*-Hybridisierung lokalisiert werden, *PaSUT1* im Transfusionsparenchym und *PaSUT2* im Phloem. Dies lässt die Annahme zu, dass es einen aktiven Saccharose-Transport im *pre-phloem-pathway*, sowie eine aktive Phloembeladung gibt. Für die Laubblatt-tragenden Gymnospermen *G. biloba* und *G. gnemon* konnten hingegen noch keine genaueren Aussagen zum Phloembeladungs-Mechanismus getroffen werden. Obwohl in *G. biloba* die Expression von je einem SUT der drei Typen nachgewiesen werden konnte, war die biochemische Charakterisierung der Transporter mittels Hefekomplementation bisher nicht erfolgreich. Die Bestimmung der Verteilung der Photoassimilate in den subzellulären Kompartimenten von Mesophyllzellen der *source*-Blätter für *G. gnemon* und der basalen Angiospermen *M. kobus* zeigte eine ähnliche Verteilungen zu der anderer Angiospermen-Baumarten, die mit der apoplastischen Phloembeladung assoziiert werden. Im Gegensatz zu *M. kobus* war es noch nicht möglich, Phloemsaft von *G. biloba* und *G. gnemon* mit der Laser-Aphid-Technik zu sammeln, aber unter der Annahme, dass die Phloemkonzentration in dieser Baumart ähnlich zu der anderer Baumarten ist, wäre auch die Saccharose-Konzentration im Phloem höher als im Cytosol der Mesophyllzellen. Die Hypothese, dass bei *G. gnemon* ebenfalls aktive Schritte an der Phloembeladung beteiligt sind, wurde durch die verminderte Zuckerausscheidung aus PCMBs-behandelten angeschnittenen Blättern unterstützt.

# 1 Einleitung

## 1.1 Gymnospermen

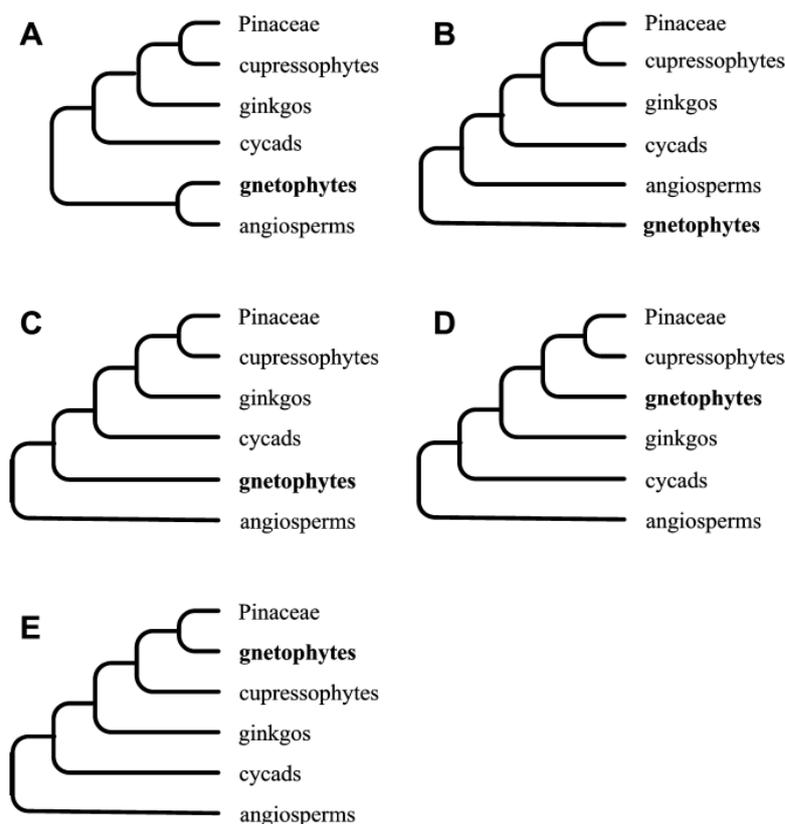
Die Gymnospermen stellen mit den Cycadeen, Ginkgo, Gnetophyta und den Koniferen (einschließlich Cupressophyta und Pinaceae) vier der fünf großen Hauptgruppen von Samenpflanzen dar, wobei *Ginkgo biloba* (L.) den einzigen rezenten Vertreter seiner Gruppe repräsentiert. Der Name Gymnospermen, „Nacktsamer“, leitet sich vom griechischen *gymnos* für nackt und *sperma* für Same ab und weist auf ein wichtiges Merkmal hin, welches allen Vertretern dieser Gruppe gemein ist. Denn im Gegensatz zu den Angiospermen (Bedecktsamern) ist die Samenanlage nicht in einen Fruchtknoten eingeschlossen, was innerhalb der Samenpflanzen den ursprünglichen Zustand darstellt (Bresinsky *et al.*, 2008). Gymnospermen sind holzige Pflanzen wie Sträucher, Bäume oder seltener auch Lianen, die sich gut an extreme Lebensräume wie boreale Wälder mit langen Wintermonaten, aber in einigen Fällen auch an tropische- oder Wüstenumgebungen angepasst haben. Zu ihnen gehört mit dem Küstenmammutbaum (*Sequoia sempervirens*) nicht nur die größte vorkommende Baumart, sondern mit der Westlichen Grannen-Kiefer (*Pinus longaeva*) zugleich auch die älteste Baumart der Erde.

Basierend auf Beweisen fossiler Funde und molekularbiologischen Untersuchungen konnte die Divergenz zwischen Gymnospermen und Angiospermen vor etwa 300-350 Millionen Jahren (mya, “million years ago”) im Karbon festgestellt werden (Magallón *et al.*, 2013). Eine Trennung der fünf Gymnospermen-Gruppen voneinander fand während des Spätkarbons bis zur Spättrias (311-212 mya) statt und damit vor dem Auftreten der frühesten Angiospermen (Magallón *et al.*, 2013). Die Gymnospermen umfassen 12 Familien und 83 Gattungen mit ungefähr 1000 Arten (Christenhusz *et al.*, 2011). Davon gehören 69 Gattungen und 614 Arten zu den Koniferen, was sie zur größten Gruppe innerhalb der Gymnospermen macht (Christenhusz *et al.*, 2011). Die Gnetophyta umfassen drei Familien (Ephedraceae, Gnetaceae und Welwitschiaceae) mit jeweils einer einzigen Gattung und die Cycadeen werden in zwei Familien (Cycadaceae und Zamiaceae) mit 10 Gattungen eingeteilt (Salas-Leiva *et al.*, 2013).

Im Vergleich zu den etwa 300.000 Arten der rezenten Angiospermen zeigen die heute noch lebenden Gymnospermen mit ihren knapp 1000 Arten zwar eine deutlich geringere Artenvielfalt, sind allerdings von großer ökologischer und ökonomischer Bedeutung (Wang und Ran, 2014). Gymnospermen kommen, mit Ausnahme der Antarktis, auf allen Kontinenten vor und allein die Koniferen machen knapp 40 % der weltweiten Wälder aus (Armenise *et al.*, 2012). Das Holz von Kiefern, Tannen, Fichten und Zedern wird für die Herstellung von Papier und Harzen verwendet, aber auch Seifen, Lacke, Lebensmittel und Gummi werden aus anderen Gymnospermen gewonnen (Zonneveld, 2012; Murray, 2013).

### 1.1.1 Phylogenie

Seit dem die erste molekularbiologische Studie, die die Schwesternbeziehung zwischen Gymnospermen und Angiospermen unterstützt, von Hori *et al.* (1985) mit 5S rRNA-Sequenzen durchgeführt wurde, wurden eine ganze Reihe weiterer Molekularbiologie-basierter Phylogenien der Gymnospermen veröffentlicht. Während dadurch einige interfamiliäre und intergenerische Beziehungen innerhalb der Gymnospermen aufgeklärt werden konnten, ist die phylogenetische Position der kleinen monophyletischen Gruppe der Gnetophyta innerhalb der Samenpflanzen weiterhin umstritten (Chaw *et al.*, 1997; Bowe *et al.*, 2000; Mathews, 2009; Ran *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2012). Im Wesentlichen werden fünf verschiedene Annahmen diskutiert, welche sich durch die unterschiedliche Stellung der Gnetophyta unterscheiden (Abbildung 1.1). Zu Beginn galten die Gnetophyta in der Anthrophyten-Hypothese (Abbildung 1.1 A) als Schwestern der Angiospermen (Doyle, 1998). Diese Hypothese wurde hauptsächlich durch morphologische, anatomische und reproduktive Merkmale unterstützt, mittlerweile aber von den meisten molekularbiologischen Studien in Frage gestellt (Xi *et al.*, 2013; Wang und Ran, 2014).



**Abbildung 1.1: Hypothesen zur phylogenetischen Stellung der Gnetophyta innerhalb der Samenpflanzen.** A Anthrophyten-Hypothese: Gnetophyta als Schwestergruppe der Angiospermen. B Gnetophyta-Schwestern-Hypothese: Gnetophyta als Schwestergruppe aller anderen Samenpflanzen. C Gnetophyta-Schwestern-Hypothese II: Gnetophyta als Schwestergruppe aller anderen Gymnospermen. D Gnetifer-Hypothese: Gnetophyta als Schwestergruppe der Koniferen. E Gnepine-Hypothese: Gnetophyta als Schwestergruppe der Pinaceae. Abb. aus Wang und Ran (2014).

Obwohl die beiden Hypothesen, die die Gnetophyta entweder als Schwestergruppe zu allen anderen Samenpflanzen (Abbildung 1.1 B; Burleigh und Mathews, 2004), oder zu den anderen Gymnospermen sehen (Abbildung 1.1 C; Braukmann *et al.*, 2009), ebenfalls durch einige molekularbiologische Studien unterstützt werden, finden sie im Allgemeinen aufgrund geringer Datenlage kaum Akzeptanz (Roure *et al.*, 2013). Die meisten molekularbiologischen Phylogenie-Studien deuten darauf hin, dass die Gnetophyta in enger Beziehung zu den Koniferen stehen. Einige von ihnen unterstützen die Gnetifer-Hypothese, d.h. die Gnetophyta als Schwestern zu den Nadelbäumen (Abbildung 1.1 D), die Mehrheit allerdings die Gnepine-Hypothese, d.h. die Gnetophyta als Schwestern zu den Pinaceae (Abbildung 1.1 E). Letztere wurde von Botanikern jedoch nicht vollständig akzeptiert, da es immer noch schwierig ist die Schwesterbeziehung zwischen den Gnetophyta und den Pinaceae anhand morphologischer Merkmale zu verstehen (Wang und Ran, 2014).

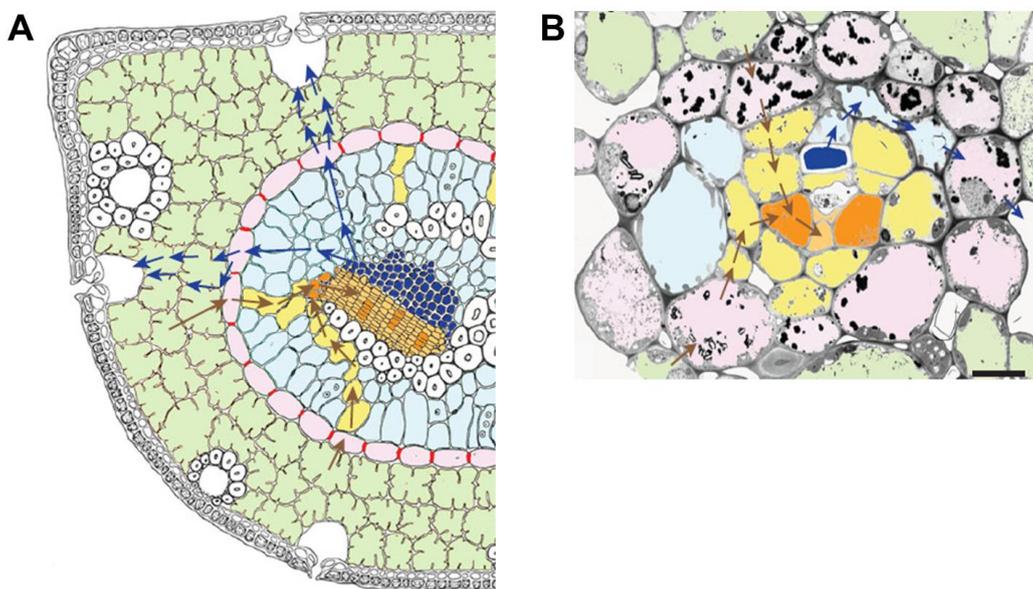
Neben den großen Anstrengungen zur Klärung der phylogenetischen Position der Gnetophyta wurden viele phylogenetische Studien an anderen Gymnospermen durchgeführt. Die jüngsten Fortschritte bei den Genomsequenzierungstechnologien, insbesondere beim *next generation sequencing*, haben eine schnelle Sequenzierung eines kompletten Genoms, Transkriptoms oder einer großen Anzahl von cDNA-Sequenzen von Nicht-Modellorganismen ermöglicht (Wang und Ran, 2014). Das erste veröffentlichte sequenzierte Genom einer Gymnosperme war das Genom von *Picea abies* im Jahr 2013 (Nystedt *et al.*, 2013). Mittlerweile sind bereits fünf weitere Koniferengenome (Zimin *et al.*, 2014; Warren *et al.*, 2015; Crepeau *et al.*, 2017; Neale *et al.*, 2017; Mosca *et al.*, 2019), sowie das Genom von *Ginkgo biloba* (Guan *et al.*, 2016) und *Gnetum montanum* (Wan *et al.*, 2018) entschlüsselt worden. Dies stellt eine wichtige Basis für die evolutionäre Erforschung von Gymnospermen, insbesondere des Mechanismus der Genomevolution und der genetischen Grundlagen morphologischer Merkmale, dar (Wang und Ran, 2014).

### 1.1.2 Blattanatomie

Gymnospermen im Allgemeinen haben viele verschiedene Blattformen wie Nadeln, Schuppen, gefiederte und breite Blätter entwickelt. Ihr xeromorpher Charakter spiegelt sich in einer Epidermis mit dicken, eingeschnittenen Außenwänden wider, die oft durch subkutane Sklerenchymfasern verstärkt wird. Die in die Blattoberfläche eingelassenen Stomata sind in der Regel auf der adaxialen Seite in Reihen angeordnet. In den Nadeln der Koniferen sind die Gefäßbündel in einem oder zwei zentralen Strängen angeordnet. Die Blätter von *Ginkgo biloba* zeigen hingegen eine dichotome Aderung, Welwitschia-Blätter eine Parallelnervatur und *Gnetum* eine netzförmige Aderung mit mindestens fünf Aderklassen, ähnlich den meisten dikotylen Laubbäumen (Liesche *et al.*, 2011a).

Unabhängig von den verschiedenen Blattformen der Gymnospermen besteht das Leitgewebe aus axialen Xylem- und Phloem-Elementen, die in das charakteristische Transfusionsgewebe

eingebettet sind (Abbildung 1.2). Struktur, Menge und Anordnung des Transfusionsgewebes können je nach Art variieren (Esau, 1965). Das Transfusionsgewebe besteht wiederum aus den Transfusionstracheiden und dem Transfusionparenchym.



**Abbildung 1.2: Anordnung der verschiedenen Gewebetypen und Transportwege in Gymnospermen-Blättern.** **A** Schematische Zeichnung eines Nadelquerschnitts von *Pinus sylvestris*. **B** Elektronenmikroskopische Aufnahme einer *minor vein* von *Gnetum gnemon*. Der *pre-phloem-pathway* (braune Pfeile) vom Mesophyll (grün) kreuzt die Bündelscheide (Rot), das Transfusionsparenchym (gelb) und die Strasburger-Zellen (dunkles Orange), bevor er die Siebelemente erreicht (helles Orange). Der *post-xylem-pathway* (blaue Pfeile) beginnt in den Transfusionstracheiden (hellblau) über die Bündelscheide und das Mesophyll zu den substomatalen Kammern. Bild **A** beruht auf Abb. 23 aus Münch (1930). Der Balken entspricht 10 µm. Abb. Aus Liesche *et al.*, 2011a (modifiziert).

Bei den Transfusionstracheiden handelt es sich um tote Zellen, die für den Wassertransport zuständig sind. Ein unterschiedlicher Grad der Verholzung ihrer Zellwände deutet darauf hin, dass einige Tracheiden für den Wassertransport und andere für die Wasserspeicherung optimiert sind. Die verholzten Wände ermöglichen es ihnen, ihre Form unter großer Wasserbelastung als Anpassung an trockene Bedingungen beizubehalten (Gadek und Quinn, 1988).

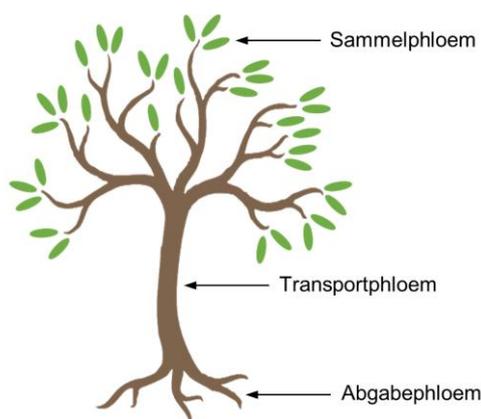
Die lebenden Zellen des Transfusionsparenchyms bilden eine Verbindung für den vom Mesophyll über die Bündelscheide kommenden *pre-phloem-pathway* zu den am Rande des Phloems gelegenen Strasburger-Zellen.

Das Transfusionsgewebe wird zum Mesophyll hin durch die Bündelscheide abgegrenzt. Sie reguliert den Austausch von Assimilaten und Wasser zwischen dem Leitbündel und dem umgebenden Gewebe. Bei den Koniferen hat sie die Eigenschaften einer Endodermis und ist mit Casparischen Streifen ausgestattet (Abbildung 1.2 A). Casparische Streifen wurden

außerhalb der Pinaceae noch nicht gefunden, aber Vertreter anderer Gymnospermen-Familien weisen verdickte und verholzte Bündelscheidenzellen auf (Lederer, 1955).

### 1.1.3 Phloem – Aufbau und Transport

Aufgrund seiner Rolle bei der Nährstoffverteilung und seiner Lage in der Pflanze wird das Phloem-Netzwerk allgemein in das Sammelpfloem, das Transportphloem und das Abgabephloem unterteilt (van Bel, 1996; Abbildung 1.3).



**Abbildung 1.3: Vereinfachte Darstellung der einzelnen Abschnitte des Phloems.** In den Blättern werden Photoassimilate gesammelt (Sammelpfloem) und über Äste und den Stamm (Transportphloem) zu den Wurzeln transportiert, wo sie ins Gewebe übergehen (Abgabephloem). Abb. aus Dobbstein, 2019 (modifiziert).

Die Siebelemente im Phloem der Gymnospermen bestehen aus Strasburger-Zellen und Siebzellen. Siebzellen sind im Allgemeinen sehr langgestreckte Zellen (1,5 bis 5 mm lang), und grenzen mit spitzwinklig-schrägstehenden Endwänden an die nächste Siebzelle an, wobei viele solcher Zellen eine Reihe bilden. In den überlappenden Enden der Siebzellen befinden sich zahlreiche Siebfelder mit Siebporen, die grundsätzlich denselben Differenzierungsgrad wie die Siebfelder der lateralen Wände haben (Esau, 2006). Im Gegensatz zu den Angiospermen haben Siebzellen keine benachbarte Geleitzelle, sondern sind funktional über Plasmodesmata mit den Strasburger-Zellen verbunden. Strasburger-Zellen sind dabei mit den benachbarten Siebzellen ontogenetisch nicht verwandt. Darüber hinaus sind die Siebporen der Siebzellen, anders als die offenen Siebporen der Siebröhrenelemente von Angiospermen, von zahlreichen Elementen des tubulären Endoplasmatischen Retikulums (ER) durchzogen (Esau, 2006).

Einmal in das Phloem geladen, bewegt sich Saccharose entlang hydrostatischer Druckgradienten durch einen Massenstrom im Transportphloem. Das Transportphloem befindet sich in den großen Blattadern, Stielen, Ästen, Zweigen, Stämmen und Wurzeln. Entlang des Transportphloems muss eine energieabhängige aktive Aufnahme von Saccharose aus dem Apoplasten in das flankierende Gewebe für verschiedenste Stoffwechselreaktionen, Wachstum und Speicherung erfolgen. Ferner muss die Saccharose auch wieder in das Phloem zurücktransportiert werden, um den hohen Zuckergehalt im Phloem und den hydrostatischen

Druck aufrechtzuerhalten (Hafke *et al.*, 2005). In den *sink*-Organen werden die Photoassimilate im Abgabephloem entladen. Zusätzlich zu den Photoassimilaten werden noch weitere Stoffe, wie Aminosäuren, anorganische Ionen, Nukleinsäuren und Proteine, im Phloem transportiert (Byrne und Miller 1990; Ohshima *et al.*, 1990; Atkins *et al.*, 2011).

Der genaue Mechanismus des Phloem-Transports in Gymnospermen ist noch nicht bekannt, aber er wird trotz des Widerstands der ER-Tubuli in den Siebporen aufrechterhalten. Deshalb wurde von Schulz (1992) angenommen, dass das ER der Siebzellen den Langstrecken-Gradient der Assimilate reguliert und der Phloem-Transport in Gymnospermen nicht nur auf der Beladung in den *source*-Blättern und der Entladung in *sink*-Gewebe beruht, sondern dass es energieabhängige Schritte innerhalb des Transportweges gibt (Schulz, 1992). Aktuelle Erkenntnisse deuten darauf hin, dass Gymnospermen im Grunde genommen den gleichen Mechanismus anwenden wie Angiospermen mit einem insgesamt kontinuierlichen Druckgefälle von *source* zu *sink*-Gewebe, was den Massenstrom antreibt, wobei die Rolle des ER weiterhin nicht geklärt ist (Liesche und Schulz, 2018).

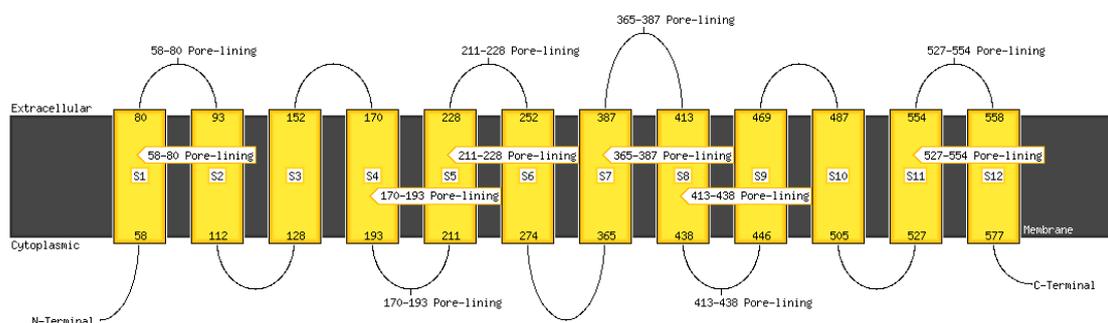
## 1.2 Saccharose-Transporter – Struktur und Funktion

Die Schlüsselenzyme für Transfer und Verteilung von photosynthetisch gebundenem Kohlenstoff im Phloem der *minor veins*, sowie bei Entladeprozessen in *sink*-Gewebe, sind als SUT (*sucrose uptake transporter*) oder SUC (*sucrose uptake carrier*) bezeichnete Transportproteine.

Bei den SUT handelt es sich um Membranproteine der glycosid-pentosid-hexuronid (GPH)-Symporter, welche zur übergeordneten Gruppe der sogenannten *major facilitator superfamily* (MFS) gehören (Marger und Saier, 1993). In ihrer Funktion als Symporter vermitteln sie den aktiven Transport von Saccharose und Protonen mit einer 1:1-Stöchiometrie über Plasmamembranbarrieren (Bush, 1990; Boorer *et al.*, 1996; Carpaneto *et al.*, 2005). Der erste experimentelle Nachweis, dass Saccharose-Transport in höheren Pflanzen elektrogen sein kann und von Protonen als Co-Substrat abhängt, wurde bereits vor mehr als 35 Jahren in Analysen mit intaktem Pflanzengewebe erbracht (Delrot und Bonnemain, 1981). Allerdings war es erst nach der Klonierung der ersten SUT-cDNA aus Spinat und der Expression in der Bäckerhefe (Riesmeier *et al.*, 1992) möglich Reaktionskinetiken, pH-Optima, Substrate und Inhibitoren für einzelne SUT zu bestimmen. Seitdem wurden in krautigen Pflanzen und Bäumen eine Vielzahl weiterer SUT untersucht (Lalonde *et al.*, 1999; Lemoine; 2000; Decourteix *et al.*, 2006; Payyavula *et al.*, 2011; Tang *et al.*, 2010; Öner- Sieben *et al.*, 2015; Dobbstein *et al.*, 2018). Die in der Regel 500-600 Aminosäure großen Transportproteine bestehen aus insgesamt 12  $\alpha$ -helikalen membranständigen Domänen (Williams *et al.*, 2000), die in zwei 6er-Blöcken angeordnet und über einem zentralen cytoplasmatischen *loop* verbunden sind (Abbildung 1.4).

Wie der zentrale *loop*, liegen N- und C-Terminus ebenfalls auf der cytoplasmatischen Seite (Stolz *et al.*, 1999).

b3871030-f46a-4a5d-b8b2-a7db59656b91.seq.job

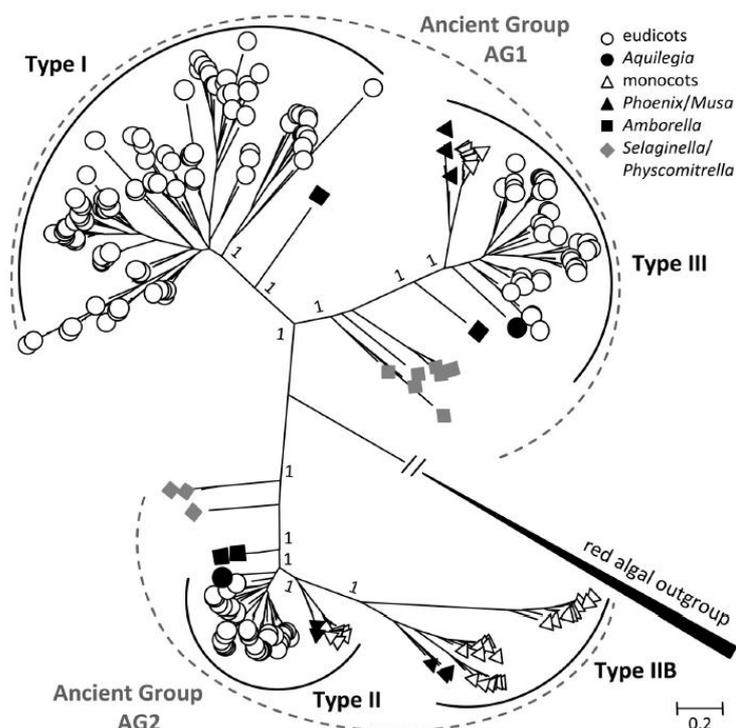


**Abbildung 1.4: Grundstruktur eines Saccharose-Transporters.** Die membranständigen Transporter bestehen aus 12  $\alpha$ -helikalen Transmembrandomänen (TMD) mit einem cytoplasmatischen *loop* zwischen TMD 6 und 7, sowie einem cytoplasmatischen N- und C-Terminus. Strukturmodell vom Typ II-Transporter PaSUT2 aus *P. abies* (MH281473, Dobbstein *et al.*, 2018) erstellt auf dem PSIPRED-Server (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>, Buchan und Jones, 2019).

SUT werden von kleinen Genfamilien codiert und konnten sowohl in allen Landpflanzen, als auch in der Grünalge *Chlorokybus atmophyticus* gefunden werden, die zu den Vorläufern der Landpflanzen zählt (Reinders *et al.*, 2012). Basierend auf Sequenzhomologie und biochemischer Aktivität wurden die SUT in verschiedene Gruppen, Typen, Kladen oder Unterfamilien unterteilt, je nach gewählter Nomenklatur der Autoren (Sauer, 2007; Braun und Slewinski, 2009; Reinders *et al.*, 2012; Peng *et al.*, 2014). Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Einteilung der SUT nach der Nomenklatur von Peng *et al.* (2014), wonach die SUT in vier Gruppen (Typ I, II, IIB und III) eingeteilt sind (Abbildung 1.5).

Die Mitglieder eines jeden Typs weisen sowohl gemeinsame strukturelle, als auch funktionelle Merkmale auf. In Abhängigkeit ihrer gewebespezifischen Expression in *source*-Blättern (Riesmeier *et al.*, 1993; Stadler *et al.*, 1995), Pollen (Lemoine *et al.*, 1999), Wurzeln (Flemetakis *et al.*, 2003) oder Xylem (Decourteix *et al.*, 2006) und der unterschiedlichen Lokalisation in der Plasmamembran oder dem Tonoplasten, nehmen sie die unterschiedlichsten Aufgaben wahr.

Bei den Mitgliedern der Typ I-Gruppe handelt es sich um hoch-affine SUT mit  $K_M$ -Werten zwischen 139  $\mu\text{M}$  und 1,5 mM (Kühn, 2003), die bisher nur in Eudikotyledonen gefunden werden konnten. Aufgrund ihrer Lokalisation in den Geleitzellen und Siebelementen werden sie mit der Phloembeladung assoziiert (Riesmeier *et al.*, 1994; Gottwald *et al.*, 2000). Weitere essentielle Funktionen sind unter anderem die Rückgewinnung von Saccharose in das Phloem während des Langstrecken-Transports (Minchin und Thorpe, 1987) und eine Beteiligung an der Pollen- und Knollenentwicklung (Sivitz *et al.*, 2008; Kühn *et al.*, 2003).



**Abbildung 1.5: Stammbaum von Saccharose-Transportern aus 41 sequenzierten Pflanzengenomen.** Die Transporter bilden vier verschiedene Gruppen (Typ I, II, IIB und III), die in zwei ursprüngliche Gruppen AG1 und AG2 eingebettet sind, wobei die Sequenz aus der Rotalge *Galdiera sulphuraria* als Außengruppe dient. Typ II und Typ III stellen evolutionär konservierte Gruppen mit sowohl monokotylen- als auch eudikotylen-Vertretern dar, während Typ I und Typ IIB nur in Eudikotylen bzw. Monokotylen vorkommen. Abb. aus Peng *et al.*, 2014.

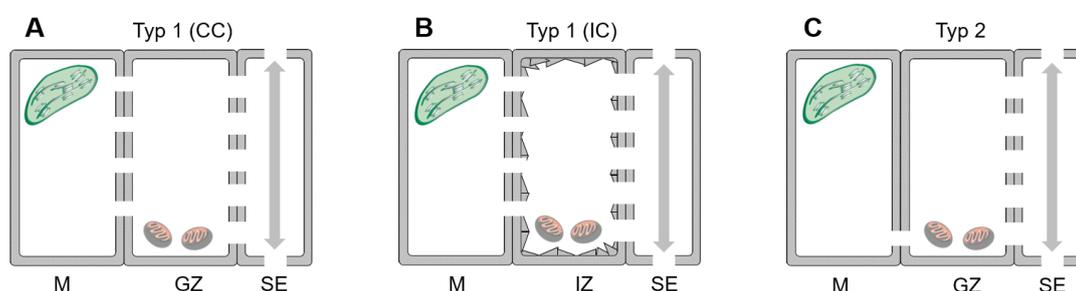
SUT vom Typ II ließen sich bislang in jedem analysierten Pflanzengenom, einschließlich der primitiven Landpflanzen *Physcomitrella* und *Selaginella*, nachweisen (Reinders *et al.*, 2012). Sie unterscheiden sich strukturell durch eine längere N-terminale Domäne und einen längeren zentralen *loop* von den SUT der anderen Gruppen. Wegen dieser strukturellen Unterschiede und ihrer geringen Substrataffinität wurde angenommen, dass sie als Saccharose-Sensoren eine Rolle spielen. Allerdings konnte diese Vermutung bisher nicht verifiziert werden und wird in der Literatur kontrovers diskutiert (Barker *et al.*, 2000; Eckhardt, 2003; Hackel *et al.*, 2006). Diese Gruppe wird weiter in die Monokotylen-spezifische Untergruppe IIB unterteilt. Monokotyle Arten nutzen Typ II-SUT für die Phloembeladung (Slewinski *et al.*, 2009) und auch eine Rolle bei der Phloementladung und dem Import von Saccharose in *sink*-Gewebe wurde mehreren Mitgliedern dieser Gruppe zugewiesen (Kühn und Grof, 2010).

Typ III-SUT wurden zunächst aus *Arabidopsis*, Kartoffel und Tomate geklont und ebenfalls als H<sup>+</sup>-gekoppelte Symporter charakterisiert (Weise *et al.*, 2000). Sie sind an der Vakuolenmembran lokalisiert (Endler *et al.*, 2006; Reinders *et al.*, 2008) und sorgen für die Saccharose-Aufnahme in das Cytoplasma (Reinders *et al.*, 2008; Schulz *et al.*, 2011). Bei den Solanaceae befinden sich die Typ III-SUT auch an der Plasmamembran und ihre Hauptfunktion scheint dort Licht- und Hormonwahrnehmung zu sein (Chincinska *et al.*, 2008; Chincinska *et al.*, 2013).

### 1.3 Mechanismen der Phloembeladung

Zur Vorbereitung auf den Langstreckentransport bewegt sich Saccharose, die in den Mesophyllzellen produziert wird, in Richtung des Sammelpfloems der *minor veins*, in denen die Phloembeladung stattfindet. Es werden drei mögliche Beladungsmechanismen beschrieben, die sich durch die Morphologie der *minor veins* (Gamalei, 1989), der transportierten Zucker (Zimmermann und Ziegler, 1975), dem Vorhandensein von Konzentrationsgradienten für die transportierten Zucker zwischen dem Mesophyll und dem Phloem (Lohaus *et al.*, 1995, Nadwodnik und Lohaus, 2008), sowie der Beteiligung von Saccharose-Transportern (SUT) (Riesmeier *et al.*, 1992; Sauer und Stolz, 1994) unterscheiden: Apoplastische-, symplastische- und passive Phloembeladung.

Erste Hinweise darauf, dass sich die Phloembeladungs-Strategien unterscheiden, kamen aus anatomischen Studien. Gamalei (1989; 1991) hat in einer umfangreichen Studie gezeigt, dass die Anzahl der Plasmodesmata im Phloem der *minor veins* variieren und gruppierte Pflanzen in verschiedene Typen ein: Typ 1 besitzt eine Vielzahl von Plasmodesmata zwischen Geleit- und Mesophyllzellen (Abbildung 1.6 A, B), während die Geleitzellen des als geschlossen bezeichneten Typ 2 nur wenige bis keine Verbindungen zu den umliegenden Mesophyllzellen aufweisen (Abbildung 1.6 C).

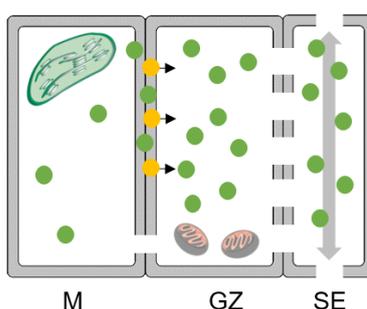


**Abbildung 1.6: Übersicht der verschiedenen *minor vein* Typen.** **A** Offener Typ 1 mit normalen Geleitzellen (GZ). **B** Offener Typ 1 mit Intermediärzellen (IZ). **C** Geschlossener Typ 2. M: Mesophyllzelle, SE: Siebelement. Abb. aus Dobbstein, 2019.

Davidson *et al.* (2011) unterteilten den Typ 1 anhand ihrer Geleitzellen-Anatomie in zwei Untergruppen: Der Typ 1 (CC) besitzt sog. gewöhnliche Geleitzellen mit einer glatten Zellwand und der Typ 1 (IC) verfügt über spezialisierte Geleitzellen, die als Intermediärzellen (IC) bezeichnet werden. Intermediärzellen sind große Zellen mit dichtem Cytoplasma und einer großen Ansammlung von endoplasmatischem Retikulum, welches sich an der Zellwand anlagert und ihr eine raue Struktur verleiht. Alle Arten mit Intermediärzellen transportieren Raffinose und Stachyose. (Turgeon *et al.*, 1993).

### 1.3.1 Apoplastische-Beladung

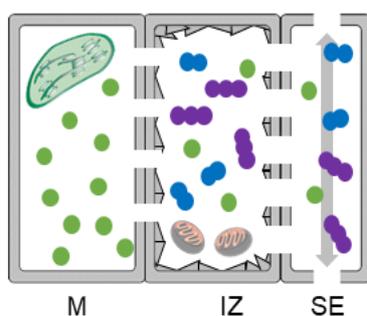
Bei Pflanzenarten mit dem geschlossenen *minor vein* Typ 2 sind die Geleitzellen von den Mesophyllzellen symplastisch isoliert. Deshalb muss die Saccharose zunächst in den Apoplasten exportiert werden. Dafür zeichnen sich unter anderem die sog. SWEET-Transporter (*Sugars Will Eventually be Exported Transporter*) verantwortlich, welche den Saccharose-Export durch vereinfachte Diffusion aus den Zellen in den Apoplasten ermöglichen (Baker *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2012). Der anschließende Import der Saccharose in die Geleitzellen erfolgt durch plasmamembran-lokalisierte  $H^+$ -abhängige Saccharose-Transporter und wird energetisch von einer plasmamembrangebundenen  $H^+$ -ATPase angetrieben (Lalonde *et al.*, 2003). Aus den Geleitzellen kann die Saccharose weiter in die Siebelemente diffundieren.



**Abbildung 1.7: Apoplastische Phloembeladung.** Durch die fehlenden Plasmodesmata zwischen Mesophyllzelle (M) und Geleitzelle (GZ) wird die Saccharose (grün) in den Apoplasten exportiert und durch SUT (gelb) in die Geleitzellen aufgenommen. Von dort aus diffundiert sie in das Siebelement (SE). Abb. Aus Döbelstein, 2019.

### 1.3.2 Symplastische-Beladung

Pflanzenarten mit Intermediärzellen (Abbildung 1.6 B) werden als symplastische Phloembelader charakterisiert (Turgeon, 1996; Beebe und Russin, 1999). Das Auftreten von Intermediärzellen korreliert immer mit dem Transport von großen Mengen an Zuckern der Raffinose-Oligosaccharid-Familie (RFO), wie Raffinose und Stachyose, mit einem kleinen Anteil an Saccharose (Turgeon *et al.*, 1993).

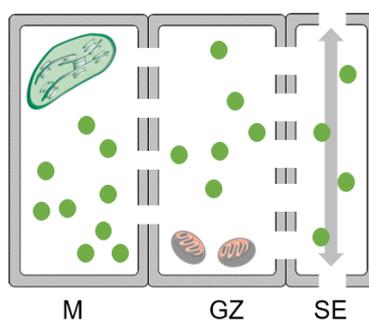


**Abbildung 1.8: Symplastische Phloembeladung (polymer-trap).** Die Saccharose (grün) diffundiert aus den Mesophyllzellen (M) in die Intermediärzellen (IZ) und wird dort zu RFO (blau: Raffinose; violett: Stachyose) umgesetzt. Von dort aus diffundieren sie ins Siebelement (SE). Abb. aus Döbelstein, 2019.

Bei der symplastischen Phloembeladung diffundiert Saccharose über Plasmodesmata aus den Mesophyllzellen in die Intermediärzellen. Dort wird aus Saccharose durch die Addition von Galactinol durch das Enzym Raffinosesynthase Raffinose synthetisiert. Durch die Addition eines weiteren Galactinols an die vorhandene Raffinose durch die Stachyosesynthase entsteht Stachyose (Voitsekhovskaja *et al.*, 2009; Cao *et al.*, 2013). Die Verlängerung der Saccharose mit Galactinol wird in einigen Pflanzenarten bis hin zur Verbascose fortgeführt (Turgeon und Medville, 2010). Durch die Synthese höhermolekularer Zucker aus Saccharose bleibt der Diffusionsgradient zwischen den Mesophyll- und Intermediärzellen bestehen. Da die RFO aufgrund ihrer Molekülgröße nicht mehr zurück in die Mesophyllzellen diffundieren können spricht man bei dieser Form der Beladung vom sog. *polymer trapping* (Turgeon und Beebe, 1991). Obwohl das *polymer trapping* keinen aktiven Transport beinhaltet, wird es als aktiver Mechanismus gesehen, da Energie verwendet wird, um eine Konzentrationsdifferenz zwischen dem Mesophyll und dem Phloem zu erzeugen (Turgeon, 2010b).

### 1.3.3 Passive-Beladung

Im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen aktiven Mechanismen erfolgt die Phloembeladung bei Pflanzen mit offener *minor vein*-Anatomie und Saccharose als Haupttransportzucker rein passiv durch Diffusion (Abbildung 1.9). Die in den Mesophyllzellen synthetisierte Saccharose diffundiert entlang eines Konzentrationsgradienten über Plasmodesmata durch die Geleitzellen bis hin zu den Siebelementen. Die passive Beladung des Phloems wurde für Bäume das erste Mal nach Plasmolyse-Versuchen an der Trauerweide (*Salix babylonica*) durch Turgeon und Medville (1998) postuliert, bei denen die Zellen des Phloems bei ähnlichen Konzentrationen plasmolysierten wie die des umliegenden Mesophylls. Sie gilt als evolutiv ursprünglich und stellt die einfachste Form der Phloembeladung dar (De Schepper *et al.*, 2013).



**Abbildung 1.9: Passive Phloembeladung.** Die Saccharose (grün) diffundiert entlang ihres Konzentrationsgradienten aus den Mesophyllzellen (M) durch die Geleitzelle (GZ) in das Siebelement (SE). Abb. aus Döbelstein, 2019.

## 1.4 Fragestellungen

Während die meisten Studien über Phloembeladungs-Mechanismen und Saccharose-Transporter an krautigen Pflanzen durchgeführt wurden, ist die Phloembeladung in Bäumen nicht in gleichem Maße untersucht worden. Für Bäume wird eine passive Phloembeladung angenommen, welche bei den Gymnospermen und basalen Angiospermen als der ursprüngliche Mechanismus angesehen wird. Da in den letzten Jahren immer mehr Saccharose-Transporter in verschiedenen Angiospermen-Baumarten gefunden und mit der Phloembeladung in Verbindung gebracht werden konnten, sollten im Rahmen dieser Arbeit die Gymnospermen *Picea abies* (H. KAARST), *Ginkgo biloba* (L.) und *Gnetum gnemon* (L.) hinsichtlich ihres Phloembeladungs-Mechanismus und Zuckertransports untersucht werden. Dazu wurden folgende Fragestellungen bearbeitet:

- Gibt es Saccharose-Transporter in Gymnospermen? und wenn ja:
  - welchem Typ können sie zugeordnet werden?
  - in welchen Geweben werden sie exprimiert?
  - in welchen Zelltypen sind sie lokalisiert?
  - welche biochemischen Eigenschaften haben sie?
- Wie sieht die Blatt-, *minor vein*- bzw. Leitbündelanatomie aus?
- Welche Zucker werden im Phloem transportiert?
- Gibt es einen Konzentrationsgradienten von Zucker(n) zwischen dem Cytosol der Mesophyllzellen und dem Phloem?
- Welchen Einfluss haben jahreszeitliche Veränderungen und andere Umweltfaktoren auf die SUT-Expression und den Zuckermetabolismus?

Zur Beantwortung dieser Fragen kommen verschiedene biochemische und molekularbiologische Methoden zum Einsatz. Um eine evolutive Komponente hinzuzufügen, wurde die basale Angiosperme *Magnolia kobus* (DC.) in die Untersuchungen mit einbezogen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien und Geräte

Die verwendeten Chemikalien wurden jeweils im höchstmöglichen Reinheitsgrad bezogen. Eine detaillierte Auflistung aller verwendeten Chemikalien und ihrer Bezugsquellen, sowie der verwendeten Laborgeräte befindet sich im Anhang.

#### 2.1.2 Pflanzen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden insgesamt vier verschiedene Baumarten untersucht. Mit Ausnahme von *Gnetum gnemon* (*G. gnemon*) wurden alle Bäume als 3-jährige Setzlinge von der Baumschule Selders (Haan, Deutschland) bezogen. Bei *G. gnemon* handelte es sich um 9-jährige Pflanzen aus dem botanischen Garten der Ruhr-Universität Bochum.

**Tabelle 2.1: Untersuchte Baumarten**

Art	Trivialname	Familie	Erstbestimmer
<i>Gnetum gnemon</i>	Melinjo	Gnetaceae	Linné (L.)
<i>Ginkgo biloba</i>	Fächerblattbaum	Ginkgoaceae	Linné (L.)
<i>Magnolia kobus</i>	Kobushi-Magnolie	Magnoliaceae	Candolle (DC.)
<i>Picea abies</i>	Gemeine Fichte	Pinaceae	Karst (H.KARST)

##### 2.1.2.1 Haltung und experimentelle Bedingungen

Alle Bäume wurden in Gewächshäusern auf dem Campus der Bergischen Universität Wuppertal gehalten (51° 14' 42" N, 7° 9' 5" O). *G. gnemon* wurde in einem Gewächshaus mit automatisiertem Beleuchtungs- und Bewässerungssystem gehalten (14 h Licht / 10 h Dunkelheit; tägl. Bewässerung). Die Temperatur betrug ganzjährig ca. 25 °C am Tag und 18 °C in der Nacht und die Lichtintensität lag bei ca. 300  $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

Die übrigen Bäume wurden in einem offenen Kaltgewächshaus gehalten. Das Dach bestand aus UV-durchlässigem Plexiglas und die Dachfenster waren so weit geöffnet, dass einerseits kein Regen hinein und sich andererseits keine Hitze stauen konnte. Die Pflanzen wurden regelmäßig gegossen.

##### 2.1.3 Bakterienstämme

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

**Genotyp:** *F* ( $\Phi\text{dlacZ}\Delta\text{M15}$ ) *recA1 end A1 gyrA96 thi-1 hsdR17 (r<sub>k</sub><sup>-</sup> m<sub>k</sub><sup>+</sup>) supE44 relA1 deoR*  $\Delta(\text{lacZY-}ar\text{fF})$  U169

## 2.1.4 Plasmide

**Tabelle 2.2: Verwendete Plasmide**

Vektor	Selektionsmarker	Referenz
pGEM-T-easy	Ampicillin	Fa. Promega
pNEV-N	Ampicillin, URA3	Sauer und Stolz (1994)

## 2.1.5 Enzyme

**Tabelle 2.3: Verwendete Enzyme**

Enzym	Firma
$\alpha$ -Amylase	Merck
$\alpha$ -Mannosidase	Merck
Alkaline Phosphatase	Thermo Scientific
Amyloglukosidase	Merck
DNaseI	Thermo Scientific
<i>EcoRI</i>	Thermo Scientific
Glukose-6-Dehydrogenase	Merck
Hexokinase	Merck
Ligase	Thermo Scientific
Lysozym	Roth
<i>NcoI</i>	NEB
<i>NotI</i>	Thermo Scientific
Phusion-Polymerase	Thermo Scientific
RNaseA	Thermo Scientific
SP6-Polymerase	Thermo Scientific
<i>SpeI</i>	NEB
<i>Taq</i> -Polymerase	Roth
T7-Polymerase	Thermo Scientific
UGPase	Merck

## 2.1.6 Größenstandards

In der Gelelektrophorese wurde der Größenstandard GeneRuler 1 kb plus der Fa. Thermo Scientific eingesetzt.

## 2.1.7 Kits

**Tabelle 2.4: Verwendete Kits**

Kit	Firma
GeneJET Plasmid Miniprep Kit	Thermo Scientific
GeneJET PCR Purification Kit	Thermo Scientific
GeneJET Gel Extraction Kit	Thermo Scientific
RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Scientific
Maxima SYBR Green qPCR Kit	VWR

### 2.1.8 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden entsprechend ihrer Verwendung im dafür bestmöglichen Reinheitsgrad von der Fa. Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland) bezogen. Eine komplette Übersicht der verwendeten Oligonukleotide befindet sich im Anhang.

## 2.2 Elektronenmikroskopie (TEM)

Die Analyse der Phloemstruktur und der Volumina subzellulärer Kompartimente erfolgte mittels Transmissionselektronenmikroskopie von Blättern und Nadeln in Kooperation mit Prof. Dr. Andreas Barbian von der Core Facility Electron Microscopy, UKD, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf (Fink *et al.*, 2018). Dazu wurden vollständig entwickelte Nadeln und Blätter verwendet, die in der Mitte der Vegetationsperiode gesammelt wurden.

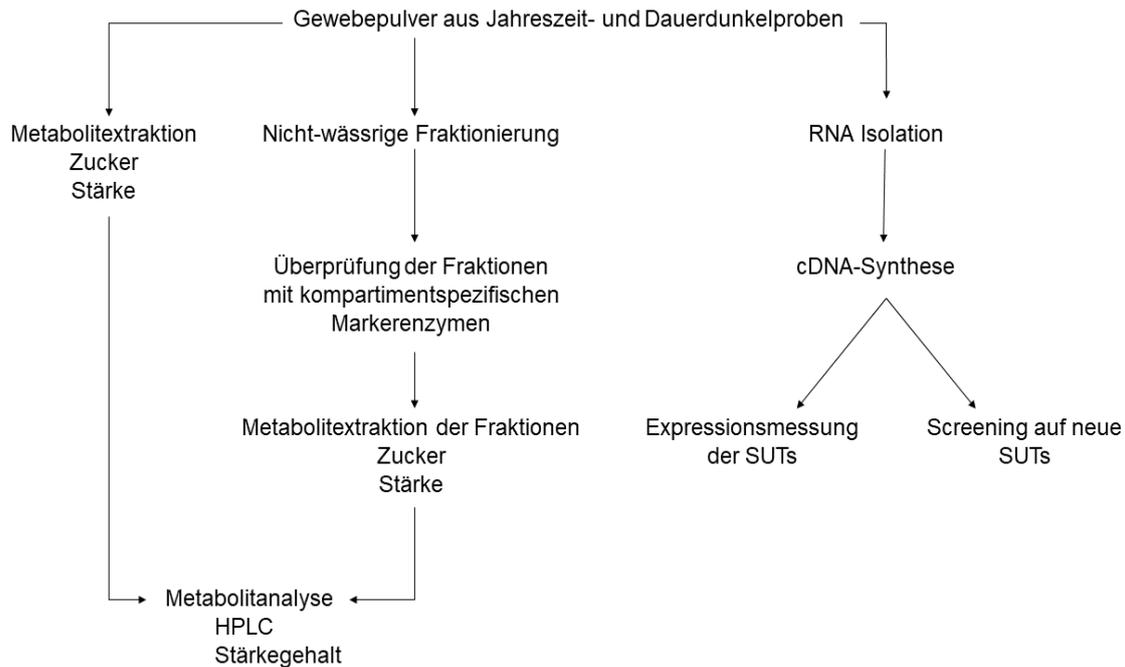
Die Blattstücke aller untersuchten Bäume wurden über Nacht in Karnovsky-Lösung (Karnovsky, 1965) fixiert. Nach der Postfixierung in 2 % Osmiumtetroxid für 120 min wurden die Proben in einer abgestuften Serie von Aceton dehydriert und in Spurr's Medium eingebettet (Spurr, 1969). Ultradünne Schnitte wurden gefärbt und mit einem Hitachi TEM H600 bei 75 kV untersucht. Die Querschnittsflächen der subzellulären Kompartimente wurden mit der Analysesoftware IMAGE J (Public Domain Software, entwickelt am US National Institutes of Health, verfügbar unter <http://rsbweb.nih.gov/ij/>) quantifiziert.

## 2.3 Extraktion von Metaboliten aus Pflanzengewebe

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

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

Um das gesammelte Pflanzenmaterial für alle weiteren Analysen aufzuarbeiten, wurden die Proben mit einer Kugelmühle zu einem feinen Pulver gemörsert. Diese Aufarbeitung geschah immer unter Zugabe von flüssigem Stickstoff, um das Auftauen der Probe zu verhindern. Dieses Pulver war Grundlage für weitere Experimente (Abbildung 2.1).



**Abbildung 2.1:** Schematische Übersicht über die experimentelle Abfolge – Metabolitextraktion und Analysen.

### 2.3.1 Zuckereextraktion

Zur Zucker-Extraktion wurden etwa 200 mg Gewebepulver verwendet. Das Gewebe wurde mit 5 mL Chloroform/Methanol (3:7 (v/v)) versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurden 5 mL H<sub>2</sub>O hinzugegeben, gevortext und kurz zentrifugiert (4.500 rpm). Die wässrige Phase wurde anschließend in einen Rundkolben gegeben und in einem Rotationsverdampfer getrocknet. Die Zucker wurden abschließend in 1 mL H<sub>2</sub>O gelöst, steril filtriert (Nylonmembran mit 0,2 µm Porengrößen) und bis zur Analyse bei -80 °C gelagert.

### 2.3.2 Stärkegewinnung

Die Stärke wurde aus dem Pellet der Zuckereextraktion gewonnen. Das Pellet wurde mit 5 mL 96 % Ethanol gewaschen, zentrifugiert (5 min | 4.500 rpm) und der Überstand vorsichtig abgegossen. Danach wurde das Pellet in 2 mL 0.2 M KOH resuspendiert und im Schüttelwasserbad inkubiert (3 h | 80 °C). Anschließend wurde der pH-Wert auf 4,5–5,0 mit 1 N Essigsäure gesenkt und die Lösung zur Homogenisierung 10 min in ein Ultraschallbad gestellt. Bis zur Analyse wurden die Proben bei -80 °C gelagert.

### 2.3.3 Gewinnung von Phloemsaft

Mit der Laser-Aphiden-Technik ist es möglich, reinen Phloemsaft zu gewinnen, da die Blattläuse mit ihrem Rüssel nur das Phloem anstechen, wodurch Kontaminationen aus dem Xylem oder umliegenden Zellen vermieden werden (Lohaus *et al.*, 1994; Knop *et al.*, 2001;

Palmer *et al.*, 2013). Dabei wird der Stechrüssel der Blattläuse mit einem Laserstrahl abgetrennt, nachdem diese eine Blattader angestochen hatten.

Dafür wurden zehn Läuse, die sich auf den Pflanzen befunden haben, in einem Käfig gefangen und dieser auf der Blattunterseite fixiert. Der Käfig wurde nach 3-5 h entfernt und die Läuse wurden in eine Halterung vor dem Okular eines Laseraufbaus eingespannt. Nachdem der Stechrüssel mit einem Laserstrahl abgetrennt wurde, wurde die Laus entfernt und der austretende Phloemsaft mit einer, parallel zur Blattoberfläche liegenden, Mikrokapillare aufgefangen. Der Phloemsaft wurde abschließend in 50  $\mu$ L *A. dest* gelöst und bis zur Analyse bei -80 °C gelagert.

### 2.3.4 Gewinnung von Blatt-Exsudaten

Die Exsudate wurden mit der von King und Zeevaart (1974) beschriebenen EDTA-basierten Exsudationsmethode gesammelt. Die Blätter wurden von der Pflanze entfernt, die Stiele angeschnitten und in eine 10 mM EDTA-Lösung (pH 6,0) gestellt und geschüttelt, um die Zucker aus den beschädigten Stielzellen zu entfernen. Im Anschluss wurden die Blattstiele in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß (RG) mit 0,5 mL frischer EDTA-Lösung überführt. Die Exsudation von Blättern fand über 5 h in einem Wärmeschrank statt.

## 2.4 Biochemische Methoden

### 2.4.1 Nicht-wässrige Fraktionierung (NWF)

Mit Hilfe dieser Methode werden die Zellkompartimente entlang eines Dichtegradienten aus n-Heptan und Tetrachlorethylen aufgetrennt (Gerhard und Heldt, 1984; Riens *et al.*, 1991; Nadwodnik und Lohaus, 2008).

Für diesen Versuch wurden 2 g Blattpulver über fünf Tage lyophilisiert. Das getrocknete Pulver wurde anschließend in 20 mL Lösung B (leichtes Gemisch aus n-Heptan und Tetrachlorethylen) resuspendiert und die Zellen mit einem Ultraschallstab aufgeschlossen (90 s, 5 s Pulsintervalle, 65 % Intensität). Die Suspension wurde mit einem Nylonnetz (Porengröße 20  $\mu$ m) gefiltert und das Netz dreimal mit je 10 mL n-Heptan gespült. Die 50 mL wurden bei 4 °C zentrifugiert (3.200 *g* | 10 min), der Überstand verworfen und das Pellet in 2,5 mL Lösung B resuspendiert. Der Dichtegradient setzte sich aus einem 1:1 Verhältnis von Lösung A (schweres Gemisch aus n-Heptan und Tetrachlorethylen) und Lösung B zusammen. Die Herstellung des Dichtegradienten erfolgte mittels eines Gradientenmischers. Zuerst wurden 2 mL Lösung A als Kissen vorgelegt. Die zwei Kammern des Gradientenmischers wurden mit je 5 mL Lösung A bzw. Lösung B gefüllt und die Flüssigkeit über einen Teflonschlauch in ein vorbereitetes Schraubgefäß geleitet. Bevor der Gradient mit der Suspension beladen wurde, wurde eine Probe der Gesamtfraktion genommen. Der beladene Gradient wurde bei 4 °C

zentrifugiert (4.500 g | 70 min). Nach der Zentrifugation hatten sich mehrere Fraktionen gebildet, wobei die Vakuolen sich im Bereich der höchsten Dichte anreicherten, die Chloroplasten im Bereich der niedrigsten Dichte und das Cytosol in der Phase mittlerer Dichte. Es wurden sechs Fraktionen unterschieden und auf sechs 15 mL Gefäße aufgeteilt, wobei das genaue Volumen notiert wurde. Die Fraktionen wurden mit n-Heptan auf 10 mL aufgefüllt, bei 4 °C zentrifugiert (4.500 g | 10 min), der Überstand verworfen und das Pellet in 2 mL n-Heptan resuspendiert. Die Proben wurden anschließend in einem Vakuum-Konzentrator getrocknet und in einem Exsikkator unter Luftabschluss gelagert.

### 2.4.2 Proteinextraktion

Für die späteren Enzym-Bestimmungen wurden Protein-Extrakte nach Stitt *et al.* (1983) angefertigt. Dazu wurden die getrockneten Fraktionen mit 500 µL STITT-Puffer (Tabelle 2.5) versetzt, das Pellet durch Vortexen gelöst und bei 4 °C zentrifugiert (20.000 g | 10 min). Der Überstand wurde in ein neues 1,5 mL RG überführt und auf Eis gelagert.

**Tabelle 2.5: Puffer für die Proteinextraktion**

Substanz	Konzentration
HEPES, pH 7,4	50 mM
MgCl <sub>2</sub>	5 mM
EDTA	1 mM
Triton-X-100	0,1 % (v/v)
Glycerol	10 % (v/v)

### 2.4.3 Proteinbestimmung

Der Proteingehalt der Extrakte wurden mit der Methode nach Bradford quantifiziert (Bradford, 1976). Es wurden 1 mL Bradford-Lösung und 1 µL Proteinextrakt gemischt und für 5 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Danach wurde die Extinktion bei 595 nm gemessen. Durch eine zuvor erstellte Eichreihe mit definierten Mengen von *Bovine Serum Albumin* (BSA) konnte anschließend die Konzentration bestimmt werden.

**Tabelle 2.6: Zusammensetzung Bradford-Lösung**

Substanz	Menge
Coomassie Brilliant Blau G-250	50 mg
Ethanol abs.	25 mL
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (95 %)	50 mL
Add. 500 mL A. Bidest	

#### 2.4.4 UDP-Glukose-Assay

Als Markerenzym für das Cytosol diente die UGPase. Um ihre Aktivität zu messen wurde die Umsetzung von  $\text{NADP}^+$  zu  $\text{NADPH}+\text{H}^+$  an ihre Reaktion gekoppelt. Im ersten Schritt wird UDP-Glukose mit Natriumphosphat ( $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ ) durch die UGPase zu Glukose-1-phosphat und UTP umgesetzt. Diese Reaktionsprodukte werden von der Phosphoglucomutase zu Glukose-6-phosphat umgewandelt. Im nächsten Schritt oxidiert die Glukose-6-Dehydrogenase das Glukose-6-Phosphat und  $\text{NADP}^+$  zu Gluconat-6-Phosphat und  $\text{NADPH}+\text{H}^+$ . Die Bildung von  $\text{NADPH}+\text{H}^+$  konnte dann photometrisch bei 334 nm verfolgt werden. Für die Messung wurden 70  $\mu\text{l}$  Proteinextrakt und alle Komponenten der Reaktionslösung (Tabelle 2.7) bis auf den Reaktionsstarter  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$  in eine Küvette gegeben und für ca. 2-3 min die Basislinie aufgenommen. Nach dem Reaktionsstart wurde 15 min lang gemessen.

**Tabelle 2.7: Reaktionslösung für das UDP-Glukose-Assay**

Substanz	Konzentration
Tris	0,1 M
$\text{MgCl}_2$	2 mM
NADP	0,25 mM
NaF	2 mM
Glukose-1,6-bisphosphat	20 $\mu\text{M}$

#### 2.4.5 $\alpha$ -Mannosidase-Assay

Die  $\alpha$ -Mannosidase, hier genutzt als Markerenzym für die Vakuole, katalysiert die Spaltung von p-Nitrophenol- $\alpha$ -D-Manno-Pyranosid (PNP-Mannosid) zu Mannose und p-Nitrophenol (p-NP), wobei letzteres bei 405 nm photometrisch bestimmt werden kann.

Für die Messung wurden 500  $\mu\text{L}$  Citratpuffer und 50  $\mu\text{L}$  Proteinextrakt in einem 2 mL RG bei 37 °C im Thermoschüttler vor inkubiert (800 rpm | 10 min). Die Reaktion wurde anschließend durch Zugabe von 500  $\mu\text{L}$  PNP-Mannosid gestartet und nach 65 min durch Zugabe von 500  $\mu\text{L}$  Borat-Lösung gestoppt. Der Blindprobe wurde nach dem Beenden der Reaktion 50  $\mu\text{L}$  Protein-Extrakt zugefügt. Anschließend erfolgte die photometrische Bestimmung des p-NP.

**Tabelle 2.8: Puffer und Lösungen für das  $\alpha$ -Mannosidase-Assay**

Puffer/Lösung	Substanz	Konzentration
Citratpuffer	Citrat pH 4,5 (mit KOH)	100 mM
PNP-Mannosidlösung	PNP-Mannosid	10 mM
Stopplösung	Borat pH 9,8	800 mM

### 2.4.6 Chlorophyllbestimmung

Für die Bestimmung der Chloroplasten wurden die Chlorophyll-Gehalte jeder Fraktion bestimmt. Dazu wurde das getrocknete Pellet aus der NWF in 1 mL Ethanol (*p.A.*) gelöst und zentrifugiert (15.000 g | 2 min). Der Überstand wurde abgenommen, 1:10 mit Ethanol (*p.A.*) verdünnt und der Chlorophyll-Gehalt bei 652 nm photometrisch bestimmt.

### 2.4.7 Zuckeranalyse

Die Bestimmung der Zucker aus Gewebeextrakten, Phloemsaft und Blattexsudaten erfolgte mithilfe einer *High-Performance-Liquid-Chromatography* (HPLC) nach Nadwodnik und Lohaus (2008). Dafür wurden die Extrakte mit Spritzenfilter (0,2 µm Porengröße) gereinigt und mit H<sub>2</sub>O soweit verdünnt (1:3-1:10), dass die Konzentration der Zucker im linearen Detektionsbereich (50-500 µM) des puls-amprometrischen Detektors lag. Die Pulseinstellungen sind in Tabelle 2.9 aufgeführt.

**Tabelle 2.9: Einstellungen für die Pulsmessungen am Amperometer**

Modus	Spannung [mV]	Dauer [ms]	Messverzögerung [ms]
Messung	50	500	400
Reinigung	700	540	
Regeneration	-800	540	

Die Beladung der Anionenaustauscher-Säule erfolgte über einen Autosampler, der die Proben über ein Ventil in die Eluenten-Zufuhr (50 mM NaOH) der Säule einspritzte. Um die erforderliche Flussgeschwindigkeit von 0,8 mL/min bei ca. 140 bar zu erreichen, wurde eine Zweikolben-Hochleistungspumpe verwendet (LC-9A; Fa. Shimadzu). Die Auftrennung erfolgte über die Anionen-Bindekapazität der stationären Phase und der Anzahl negativer Ladungen an den Zuckermolekülen in der mobilen Phase. Bei jedem Probenlauf wurde eine Standardkurve zur Konzentrations-Bestimmung mit Zuckerkonzentrationen von 50, 100, 250 und 500 µM erstellt. Die gesammelten chromatografischen Daten wurden mit der Software PeakNet (Version 5.1, Fa. Dionex) analysiert.

### 2.4.8 Stärkebestimmung

Die quantitative Bestimmung des Stärkegehaltes erfolgte über einen modifizierten photometrischen Nachweis nach enzymatischer Spaltung der Stärke durch die Amyloglukosidase (Stitt und Heldt, 1981). Es wurden 100 µL der Extraktion (Kapitel 2.3.2) mit 400 µL Spaltungs-Lösung versetzt und im Schüttelwasserbad inkubiert (4 h | 55 °C). Nach der Inkubation wurden die Proben zentrifugiert (13.000 rpm | 2 min) und der klare Überstand zur Bestimmung des Glukosegehalts verwendet. Die Glukosebestimmung erfolgte optisch-enzymatisch. In Doppelbestimmung wurden hierzu je 50 µL Probe in einer Messküvette mit 690 µL Mastermix mit Hilfe eines kleinen Plastikspatels verrührt (Tabelle 2.10).

Durch Zugabe von 0,1 U Hexokinase und 0,1 U Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase wurde die Reaktion gestartet und der Ansatz für 10 min bei RT inkubiert. Abschließend wurde die Extinktion bei 334 nm erneut gemessen. Aus der Differenz der beiden Messungen konnte mittels des Lambert-Beer-Gesetzes der Stärkegehalt berechnet werden.

**Tabelle 2.10: Puffer und Lösungen für die Stärkebestimmung**

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

### 2.4.9 PCMBS-Assay

Um die Wirkung von p-Chlormercuribenzolsulfonsäure (PCMBS) zu untersuchen, wurden die angeschnittenen Blattstiele in 0,5 mL Leitungswasser mit und ohne 1 mM PCMBS für 1 h vor der Exsudation platziert (Kapitel 2.3.4). Das PCMBS wurde in 0,1 % (v/v) Dimethylsulfoxid gelöst. Die Kontrolluntersuchungen wurden analog mit der gleichen Konzentration an DMSO durchgeführt.

## 2.5 Mikrobiologische Methoden

### 2.5.1 Steriles Arbeiten

Alle Arbeiten, die eine sterile Umgebung benötigten, wurden unter einer *laminar-flow* Sterilbank durchgeführt. Ferner wurden sterile Bedingungen durch die Verwendung von bereits sterilem Einmalmaterial oder sterilisiertem Arbeitsmaterial erreicht. Alle Medien, Puffer und Membranen wurden durch 20-minütiges autoklavieren bei 120 °C und 1 bar Wasserdampfüberdruck sterilisiert. Alle temperaturempfindlichen Substanzen wurden mit Filtern der Porengröße 0,2 bzw. 0,45  $\mu$ m sterilfiltriert.

### 2.5.2 *E. coli* – Anzucht und Lagerung

Für Flüssigkulturen wurden 3 oder 5 mL LB-Medium (Bertani, 1951) in Glasröhrchen mit entsprechenden Antibiotika versehen, mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht (ü.N.) bei 37 °C und 200 rpm auf einem Schüttler inkubiert. Ausgehend von diesen Vorkulturen konnten bei Bedarf Hauptkulturen im Verhältnis 1:100 in Glaskolben inokuliert und bei den gleichen Bedingungen bis zu einer optischen Dichte (OD) von 0,5 inkubiert werden.

**Tabelle 2.11: Zusammensetzung von Medien zur Anzucht von *E. coli* (flüssig und fest)**

Medium	Substanz	flüssig	fest
LB-Medium	Natriumchlorid	0,5 % (w/v)	1,0 % (w/v)
	Trypton	1,0 % (w/v)	1,0 % (w/v)
	Hefeextrakt	0,5 % (w/v)	0,5 % (w/v)
	Agar		1,5 % (w/v)
	pH 7,0 (mit NaOH)		
SOB-Medium	Natriumchlorid	0,05 % (w/v)	
	Trypton	2,0 % (w/v)	
	Hefeextrakt	0,5 % (w/v)	
	Kaliumchlorid	0,02 % (w/v)	
	pH 7,0 (mit NaOH)		
SOC-Medium	SOB-Medium		
	MgCl <sub>2</sub> (2M)	5 µL/mL	
	Glukose (1M)	20 µL/mL	

Auf LB-Agar-Platten mit entsprechenden Antibiotika wurden die Bakterien entweder durch Verstreichen mit einer sterilen Impföse aus einer Kryokultur oder durch Ausstreichen von 100-200 µL einer Flüssigkultur mit dem Drigalskispatel ausgebracht. Anschließend wurden die Platten bei 37 °C ü.N. inkubiert. Die LB-Agar-Platten wurden mehrere Wochen bei 4 °C gelagert. Für die Überprüfung des Transformationserfolges mittels des im pGEM-T-easy enthaltenen *lacZ*-Gens (Blau-Weiß-Selektion), wurde den Platten außerdem das Glycosid X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid) zugesetzt (Tabelle 2.12).

Für die Langzeitlagerung der Bakterien bei -80 °C wurden Kryokulturen angelegt. Dazu wurden 500 µL einer Flüssigkultur mit 500 µL einer 50 %igen Glycerin-Lösung (v/v) versetzt, in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -80 °C gelagert.

**Tabelle 2.12: Verwendete Medienzusätze und entsprechende Gebrauchskonzentrationen**

Medienzusatz	Gebrauchskonzentration	Stammlösung
Ampicillin	100,0 µg/mL	100,0 mg/mL
X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid)	80,0 µg/mL	50 mg/mL

## 2.6 Molekularbiologische Methoden

### 2.6.1 RNA-Isolierung

Alle verwendeten Verbrauchsmaterialien waren doppelt autoklaviert und die Arbeitsflächen wurden vor jeder Isolierung mit RNase AWAY<sup>®</sup> abgewischt, um RNase Kontaminationen zu vermeiden. Puffer und Lösungen wurden mit RNase-freien Reagenzien und DEPC-behandeltem H<sub>2</sub>O (0,1 % (v/v) DEPC) angesetzt. Temperaturempfindliche Materialien wurden entweder 15 min mit frisch angesetztem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3 % (v/v)) behandelt und anschließend gründlich mit DEPC-H<sub>2</sub>O gespült oder mit RNase AWAY<sup>®</sup> gereinigt. Für die Isolierung von RNA wurden

zwei unterschiedliche Methoden verwendet, da der Isolierungserfolg je nach Art verschieden war. Die Integritätsprüfung wurde über ein 1 %iges Agarosegel durchgeführt, auf welches 1 µL RNA aufgetragen, mit Ethidiumbromid (0,01 % (v/v)) gefärbt und auf einem UV-Tisch fotografiert wurde. Ebenfalls erfolgte eine photometrische Prüfung der Reinheit, wobei nur RNA verwendet wurde, welche eine 260/280-Ratio von 2-2,2 aufwies. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

### 2.6.1.1 PINE-Methode

Das verwendete Protokoll ist eine Abwandlung der Methode nach Chang *et al.* (1993). Dazu wurden ca. 200 mg des Gewebepulvers verwendet und bis zur Zugabe von 800 µL 65 °C warmen CTAB-Puffers in flüssigem Stickstoff gelagert, um die Degradation der RNA zu verhindern. Nach der Zugabe wurden die Proben in einem Thermoschüttler bei 65 °C inkubiert (15 min | 1.400 rpm) und anschließend mit je 800 µL Chloroform/Isoamylalkohol (24:1 (v/v)) versetzt, gevortext und zentrifugiert (13.000 g | 5 min). Dieser Schritt wurde so lange wiederholt, bis keine Interphase mehr zu sehen war. Die wässrige Phase des letzten Extraktionsschrittes wurde mit einem 0,25-fachen Volumenanteil 10 M Lithiumchlorid versetzt, 2-mal invertiert und auf Eis im Kühlschrank bei 4 °C ü.N. inkubiert (maximal jedoch 18 h). Am nächsten Tag wurden die Proben bei 4 °C zentrifugiert (15.000 g | 20 min), der Überstand sorgfältig entfernt und das Pellet in 400 µL auf 65 °C erwärmten SSTE-Puffer bei 42 °C in einem Thermoschüttler gelöst (1.400 rpm | 15 min). Danach wurde erneut solange mit gleichem Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1 (v/v)) extrahiert, bis keine Interphase mehr zu sehen war, mindestens jedoch zweimal. Die wässrige Phase des letzten Extraktionsschrittes wurde mit dem doppelten Volumenanteil Ethanol abs. gemischt, invertiert und 1 h bei -80 °C inkubiert. Danach wurden die Proben bei 4 °C, zentrifugiert (15.000 g | 20 min), der Überstand entfernt und das Pellet mit 500 µL 70 %igen Ethanol gewaschen (15.000 g | 5 min | 4 °C). Das Pellet wurde nach der vollständigen Entfernung des Ethanols bei 42 °C für ca. 10 min getrocknet und abschließend in 33 µL DEPC-behandeltem Wasser in einem Thermoschüttler bei 42 °C gelöst (850 rpm | 10 min).

**Tabelle 2.13: Puffer für die RNA-Isolierung (PINE)**

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

### 2.6.1.2 RNA-Isolation *G. biloba*

Zur RNA-Isolation mit guter Ausbeute und Integrität aus Gewebe von *G. biloba*, welche einen hohen Gehalt an Flavonoidglykosiden, Terpenlaktone, Kohlenhydraten und polyphenolischen Sekundärmetabolite enthalten, wurde das Protokoll von Wang *et al.* (2005) verwendet.

Dazu wurden ca. 200 mg des Gewebepulvers verwendet und bis zur Zugabe von 800  $\mu\text{L}$  65 °C warmen CTAB-Puffer-II in flüssigem Stickstoff gelagert, um die Degradation der RNA zu verhindern. Nach der Zugabe wurden die Proben in einem Thermoschüttler bei 65 °C inkubiert (10 min | 1.400 rpm). Anschließend wurde das Homogenat auf RT abgekühlt und mit 2 mL Chloroform/Isoamylalkohol (24:1 (v/v)) versetzt, gevortext und bei 4 °C zentrifugiert (11.000 g | 15 min). Die Oberphase wurde in ein neues Gefäß abgenommen, mit gleichem Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1 (v/v)) versetzt, gevortext und bei 4 °C zentrifugiert (11.000 g | 15 min). Danach wurde die Oberphase erneut in ein neues Gefäß abgenommen und mit 1/10-Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,2) sowie dem doppelten Volumen Ethanol abs. versetzt und 1 h bei -80 °C präzipitiert. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 4 °C (15.000 g | 15 min), wurde das Pellet durch die Zugabe von 1 mL 3 M Natriumacetat (pH 5,6) gewaschen und erneut bei 4 °C zentrifugiert (15.000 g | 15 min). Das Pellet wurde in 500  $\mu\text{L}$  DEPC-behandeltem Wasser bei 42 °C gelöst (800 rpm | 10 min), mit gleichem Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1 (v/v)) versetzt, gevortext und bei 4 °C zentrifugiert (11.000 g | 15 min). Danach wurde die Oberphase erneut in ein neues Gefäß abgenommen und mit 1/10-Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,6) sowie zwei-Volumen Ethanol abs. versetzt und 1 h bei -80 °C präzipitiert. Nach anschließender Zentrifugation bei 4 °C (11.000 g | 15 min), wurde das Pellet durch die Zugabe von 500  $\mu\text{L}$  70 %igen Ethanol gewaschen (11.000 g | 15 min), getrocknet und abschließend in 25  $\mu\text{L}$  DEPC-behandeltem Wasser in einem Thermoschüttler bei 42 °C gelöst (850 rpm | 10 min).

**Tabelle 2.14: Puffer für die RNA-Isolation (Wang)**

Puffer	Substanz	Konzentration
CTAB-Puffer-II	CTAB	2 % (w/v)
	Tris	100 mM
	EDTA	25 mM
	NaCl	2 M
	PVPP	2 % /w/v)
	$\beta$ -Mercaptoethanol	4 % (v/v) (frisch zugesetzt)
	pH 7,4 (mit HCl)	

### 2.6.2 DNA-Isolierung

Plasmid DNA wurde aus 3 mL Übernachtskultur von *E. coli* isoliert. Dabei wurden kommerzielle Kits nach Herstellerangaben benutzt, falls die isolierten Plasmide für Sequenzierungen verwendet werden sollten.

Für Re-Transformationen und Kontrollhydrolysen wurde die STEL-Methode verwendet. Diese Methode liefert schnell hohe Mengen an Plasmiden, die allerdings einen geringen Reinheitsgrad haben und somit nicht für sensitive Reaktionen wie Sequenzierungen geeignet sind. Die Zellen wurden pelletiert (2 min | 13.000 g), in 150  $\mu$ L STEL-Puffer resuspendiert und bei 100 °C für 30 s erhitzt. Nach anschließender Zentrifugation (20 min | 13.000 g) wurde das Pellet vorsichtig mit einem sterilen Zahnstocher entfernt. Es wurden 180  $\mu$ L Isopropanol hinzugefügt, mehrmals invertiert und für 10 min bei RT inkubiert. Die gefällte Plasmid-DNA wurde pelletiert (5 min | 13.000 g), der Überstand verworfen und das Pellet mit 500  $\mu$ L Ethanol (70 % (v/v)) gewaschen. Anschließend wurde die Flüssigkeit entfernt, das Pellet bei 45 °C getrocknet und für 10 min in 50  $\mu$ L RNase-H<sub>2</sub>O im Thermoschüttler gelöst (45 °C | 1.400 rpm). Zur Kontrolle des richtigen *inserts* wurden die Plasmide einer Restriktionshydrolyse unterzogen und anschließend auf einem Agarosegel untersucht. Dazu wurden 3  $\mu$ L Plasmid-DNA mit 0,5  $\mu$ L EcoR1 (10 U/ $\mu$ L) in einem 20  $\mu$ L Puffer-Ansatz versetzt und für 90 min bei 37 °C inkubiert. Das Enzym wurde anschließend durch Erhitzen auf 65 °C für 20 min inaktiviert. Von der Lösung wurden 5  $\mu$ L auf ein Agarosegel (1 %) aufgetragen und analysiert.

**Tabelle 2.15: Puffer für die DNA-Isolation**

Puffer	Substanz	Konzentration/Menge
STEL-Puffer	Saccharose	8 % (w/v)
	Titon-X-100	5 % (v/v)
	Tris	50 mM
	EDTA	50 mM
	Lysozym	0,5 mg/mL (frisch zugesetzt)
	pH 8,0 (mit HCl)	

### 2.6.3 cDNA-Synthese

Bei der Isolierung von RNA waren auch immer geringe Kontaminationen von genomischer DNA (gDNA) vorhanden. Damit diese die quantitativen PCR Analysen nicht beeinträchtigten, wurde vor der cDNA-Synthese eine Hydrolyse mit DNaseI vorgenommen. Dazu wurden 2  $\mu$ g RNA mit 2  $\mu$ L DNaseI (1 U/ $\mu$ L) und 2  $\mu$ L 10x-Reaktionspuffer in einem 20  $\mu$ L Ansatz gemischt und für 45 min bei 37 °C inkubiert. Nachdem die gDNA abgebaut war, wurde der Lösung 2  $\mu$ L EDTA (50 mM) hinzugefügt und diese für 10 min bei 65 °C erhitzt um die DNaseI zu deaktivieren.

Die cDNA-Synthese wurde mit einem kommerziellen Kit nach Herstellerangaben durchgeführt. Dazu wurden 1  $\mu$ g RNA und der Oligo(dT)<sub>18</sub>-Primer verwendet. Der optionale Reaktionsschritt zum Auflösen etwaiger Sekundärstrukturen wurde jedes Mal durchgeführt.

### 2.6.4 Primerdesign

Für das Screening auf SUT im Transkriptom von Arten, von denen noch keine SUT-Sequenzen vorliegen, wurden degenerierte Primer verwendet (Knop *et al.*, 2001; Dobbelstein *et al.*, 2018). Diese zeichnen sich dadurch aus, dass sie nicht artspezifisch, sondern *template*-spezifisch an eine Sequenz binden, weil *wobble*-Basen in der Primersequenz mehrere Bindungsmöglichkeiten erlauben. Dadurch lassen sich Sequenzen einer Genfamilie und ihre Homologen aus einer bisher nicht sequenzierten Art isolieren. Die Primer wurden anhand von konservierten Regionen aus Alignments der DNA- bzw. Aminosäure-Sequenzen von bekannten SUT verwandter Arten abgeleitet. Für das Design der degenerierten und auch spezifischen Primer wurden die Programme Primer3 (Version 4.1.0) und Geneious (Version R9) verwendet.

### 2.6.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR-Reaktionen wurden in einem Thermocycler mit beheizbarem Deckel durchgeführt. Nachfolgend sind die Komponenten eines PCR-Ansatzes (Tabelle 2.16) und ein typisches PCR-Programm (Tabelle 2.17) aufgeführt. Die einzelnen Parameter des PCR-Programms sowie der Reaktionsansätze wurden den spezifischen Bedingungen angepasst, um ein optimales Ergebnis zu erzielen.

**Tabelle 2.16: Zusammensetzung eines Standard-PCR-Ansatzes**

Komponente	Volumen [ $\mu\text{L}$ ]
10x-Puffer	2,5
dNTPs (10 mM)	0,5
Primer <i>forward</i> (10 $\mu\text{M}$ )	0,8
Primer <i>reverse</i> (10 $\mu\text{M}$ )	0,8
<i>Template</i> -DNA	1,0
<i>Taq</i> -Polymerase (5 U/ $\mu\text{L}$ )	0,3
Add. 25 $\mu\text{L}$ A. <i>Bidest</i>	

**Tabelle 2.17: Standard-PCR-Programm**

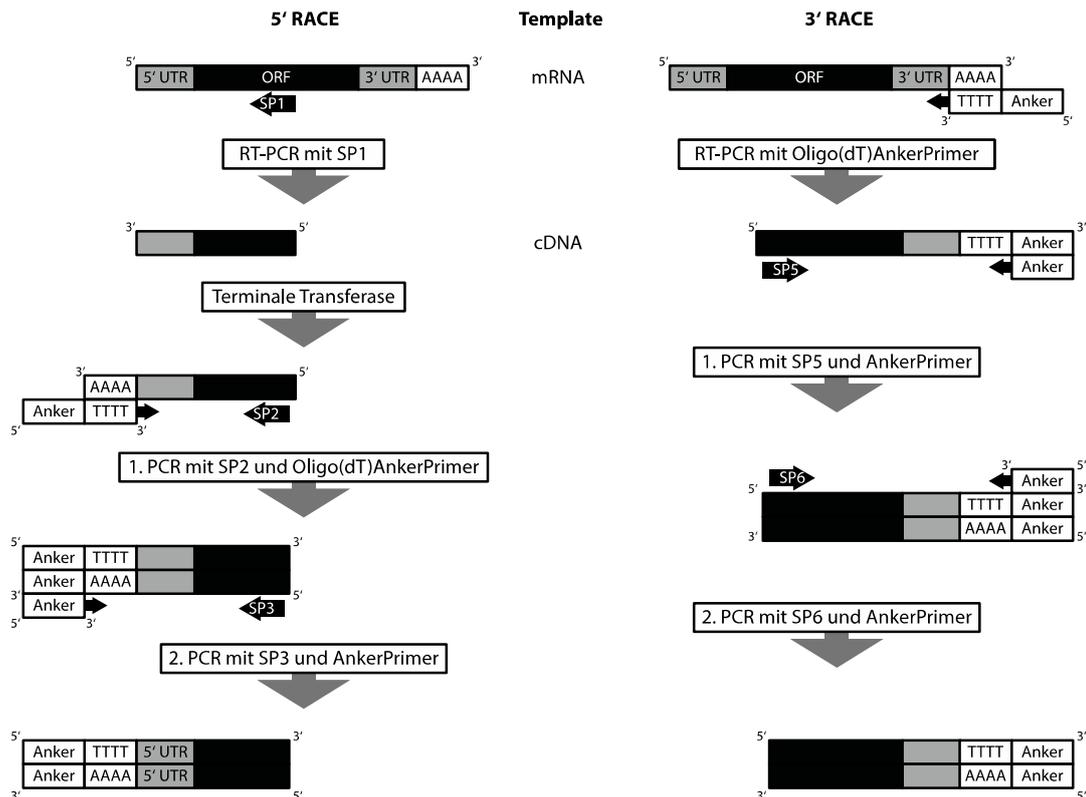
Schritt	Temperatur [ $^{\circ}\text{C}$ ]	Zeit	Zyklen
Initialdenaturierung	94	2 min	1
Denaturierung	94	20 s	24-34
<i>Annealing</i>	53-65*	30 s	
Elongation	72	x min**	
Finale Elongation	72	3 min	1
Lagerung	4	$\infty$	1

\* Die *Annealing*-Temperatur ( $T_A$ ) ist abhängig von den verwendeten Primern.

\*\* Die Elongationszeit ist abhängig von der Größe des Amplikons und der verwendeten Polymerase.

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

Mithilfe der RACE ist es möglich die Vollängensequenz eines Gens zu erhalten, von welchem zunächst nur Teilsequenzen bekannt sind. In dieser Arbeit lieferten die mit degenerierten Primern erhaltenen Sequenzteilstücke (EST) die Matrize für die Amplifizierung der cDNA-Endstücke. Die Endprodukte der jeweiligen RACE-PCR im richtigen Größenbereich wurden mit Hilfe eines kommerziellen Kits aus einem Gel ausgeschnitten, gereinigt, kloniert und sequenziert.



**Abbildung 2.2: Schematischer Ablauf eines RACE-Experiments.** Links Darstellung des Ablaufs einer 5'-Race. Rechts Darstellung des Ablaufs einer 3'-Race. Die genspezifischen Primer (SP) sind durch schwarze Pfeile dargestellt, die zugleich auch die Richtung angeben.

### 2.6.6.1 3'-RACE

Die mRNA verfügt am 3'-Ende über einen PolyA-Schwanz, sodass für die cDNA-Synthese ein Oligo(dT)-Primer mit angehängter Ankersequenz verwendet werden konnte. Die cDNA-Synthese erfolgt wie in Kapitel 2.6.3 beschrieben. Um gezielt die Transportersequenz zu amplifizieren erfolgte anschließend eine PCR mit einem ankerspezifischem sowie einem genspezifischen Primer (Abbildung 2.2).

Das PCR-Programm unterschied sich von einer Standard-PCR (Tabelle 2.16) neben einer anderen  $T_A$  insbesondere durch die Einteilung in zwei Phasen. Die erste Phase entsprach einer gewöhnlichen PCR-Reaktion, während in der zweiten Phase nach jedem Elongationsschritt die Elongationszeit um jeweils 20 s erhöht wurde, da die genaue Länge des Transkriptes unbekannt war.

### 2.6.6.2 5'-RACE

Die Amplifizierung der 5'-Enden erfordert zusätzliche Schritte, da keine äquivalente Struktur zum Poly-A-Schwanz vorhanden ist. Daher musste eine Poly-A-Primerbindestelle enzymatisch mit einer terminalen Transferase (TdT) an das 3'-Ende der durch spezifischen Primer synthetisierten cDNA angefügt werden (*A-tailing*). Vor dem *A-tailing* musste die cDNA für die 5'-RACE gereinigt werden, da die terminale Transferase jedes Nukleotid einbauen kann und somit kein reiner Poly-A-Schwanz entstehen würde. Die Aufreinigung erfolgte mit dem *High Pure PCR Product Purification-Kit* (Roche) nach Herstellerangaben.

Zu der gereinigten cDNA wurden 2,5 µL 10x TdT-Reaktionspuffer und 2,5 µL dATP (2 mM) hinzugegeben und für 3 min bei 94 °C vor inkubiert. Nach Abkühlung des Ansatzes auf Eis wurden 2 µL terminale Transferase (40 U/µL) hinzugegeben und die Probe für 45 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Erhitzen auf 70 °C für 10 min gestoppt. Anschließend erfolgte ein weiterer Reinigungsschritt, da im Reaktionspuffer der terminalen Transferase Kobalt(II)-chlorid enthalten ist. Analog zur 3'-RACE-PCR wurde auch bei der 5'-RACE zuerst eine PCR mit einem spezifischen Primer und anschließend eine *nested-PCR* durchgeführt (Abbildung 2.2).

### 2.6.7 Quantitative Echtzeit-PCR (qPCR)

Die Methode der quantitativen Echtzeit-PCR (qPCR) ermöglicht es, den relativen Transkriptionsstatus eines *gene of interest* (GOI) zu einem unregulierten *housekeeping gene* (HKG) zu bestimmen (Pfaffl *et al.*, 2004).

Dazu wird dem PCR-Ansatz SYBR Green zugesetzt. Dieser Farbstoff bindet bevorzugt an doppelsträngige DNA. Der entstehende SYBR Green-DNA-Komplex emittiert ein starkes Fluoreszenzsignal, das nach jeder Elongationsphase gemessen wird (Wittwer *et al.*, 1997).

Wenn die gemessenen Werte gegen die Zyklenzahl aufgetragen werden, entsteht ein sigmoidaler Verlauf. Der  $C_t$ -Wert (*cycle threshold*) wird an dem Punkt gemessen, an dem die Kurve das Hintergrundsignal übertrifft und in die exponentielle Phase eintritt, da hier die Effizienz der Reaktion fast 100 % beträgt. Eine absolute Bestimmung der Ausgangskonzentration der mRNA ist nur schwer möglich, da die Effizienz der reversen Transkriptase-Reaktion schwanken kann, weshalb eine Normalisierung des GOI durch das HKG notwendig ist. Zur Bestimmung der relativen Expressionsrate wird der  $C_t$ -Wert des GOI in Relation zum  $C_t$ -Wert des HKG gesetzt wobei man annimmt, dass das HKG durch das Experiment nicht in seiner Regulation beeinflusst wird (Pfaffl *et al.*, 2004; Olbrich *et al.*, 2008). Ein wichtiges Maß um die relative Expressionsrate eines Gens akkurat bestimmen zu können, ist die Effizienz der PCR-Reaktion (Wong und Medrano, 2005; Kubista *et al.*, 2006). Deshalb wurde für jedes Primerpaar die Effizienz experimentell bestimmt. Dazu wurden die cDNA aus einem Experiment gepoolt und anschließend mithilfe einer Verdünnungsreihe von 1:2 eine Standardkurve angefertigt (s. MxPro-Manual). Die Berechnungen erfolgten automatisiert

innerhalb der Analysesoftware MxPro (Version 4.10, Build 389, Fa. Stratagene). Werte zwischen 95 % und 105 % wurden als akkurat angenommen (s. MxPro-Manual) und für die Bestimmung der relativen Expression verwendet.

**Tabelle 2.18: Zusammensetzung eines Standard-qPCR-Ansatzes**

Komponente	Volumen [ $\mu\text{L}$ ]
2x Maxima-qPCR-Mastermix	5,0
ROX (1:10)	0,03
Primer <i>forward</i> (10 $\mu\text{M}$ )	0,2
Primer <i>reverse</i> (10 $\mu\text{M}$ )	0,2
Template-DNA (1:10)	3,5
Add. 10 $\mu\text{L}$ A. Bidest	

**Tabelle 2.19: Standard qPCR-Programm**

Schritt	Temperatur [ $^{\circ}\text{C}$ ]	Zeit	Zyklen
Initialdenaturierung und Aktivierung der Polymerase	945	10 min	1
Denaturierung	95	15 s	39
<i>Annealing</i>	53-65*	30 s	
Elongation	72	x min**	
Finale Elongation	72	3 min	1
Dissoziationskurve	55-95		1

\* Die *Annealing*-Temperatur ( $T_A$ ) ist abhängig von den verwendeten Primern.

\*\* Die Elongationszeit ist abhängig von der Größe des Amplikons.

Zur Optimierung der Primer und deren Konzentration wurde eine Primermatrix erstellt (Tabelle 2.20). Mit den unterschiedlichen Primerkombinationen wurden qPCR-Assays durchgeführt und sowohl die  $C_T$ -Werte als auch die finale Fluoreszenz bestimmt. Die Kombination aus Primern, mit dem kleinsten  $C_T$ -Wert und der höchsten Fluoreszenz wurde für die darauffolgenden Reaktionen gewählt. Berücksichtigt bei der Wahl der Primer wurde auch, dass die Dissoziationskurve nur ein spezifisches Produkt anzeigte, da sonst unspezifische Bindungen und Primerdimere vorhanden sein können (Ririe *et al.*, 1997).

**Tabelle 2.20: Primermatrix für die qPCR**

<i>Forward</i> [nM]	100	200	300	400	500
<i>Reverse</i> [nM]					
100	100/100	200/100	300/100	400/100	500/100
200	100/200	200/200	300/200	400/200	500/200
300	100/300	200/300	300/300	400/300	500/300
400	100/400	200/400	300/400	400/400	500/400
500	100/500	200/500	300/500	400/500	500/500

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

Die verwendete Methode basiert auf einem Protokoll von Hanahan (1983). Dazu wurde eine Vorkultur aus 3 mL LB-Medium mit *E. coli*-Zellen aus einer Kryokultur inokuliert und ü.N. bei 37  $^{\circ}\text{C}$  und 200 rpm auf einem Schüttler inkubiert. Mit dieser Vorkultur wurden dann 50 mL SOC-Medium angeimpft und solange bei 37  $^{\circ}\text{C}$  und 200 rpm inkubiert, bis die Zellen eine

OD<sub>580</sub> von 0,5 erreicht hatten. Alle nachfolgend beschriebenen Schritte wurden unter sterilen Arbeitsbedingungen und bei 4 °C durchgeführt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation sedimentiert (2.200 g | 5 min). Die geernteten Zellen wurden anschließend in 25 mL kaltem Transformationspuffer-I resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation wurden die Zellen in 5 ml Transformationspuffer-II resuspendiert, in 200 µL Aliquots auf 1,5 mL RG verteilt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

**Tabelle 2.21: Puffer für die Herstellung chemisch-kompetenter *E. coli*-Zellen**

Puffer	Substanz	Konzentration
Transformationspuffer-I	CaCl <sub>2</sub>	100 mM
	RbCl	50 mM
	MnCl <sub>2</sub>	40 mM
	sterilfiltriert	
Transformationspuffer-II	Transformationspuffer-I	
	Glycerin sterilfiltriert	20 % (w/v)

Für die Transformation der chemisch-kompetenten *E. coli*-Zellen wurde ein 200 µL Aliquot auf Eis aufgetaut, 5 - 500 ng gewünschter Plasmid-DNA oder 10 µL eines Ligationsansatzes hinzugegeben und für 20 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss erfolgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 45 s, bevor die Zellen für 2 min wieder zurück auf Eis gestellt wurden. Der Zellsuspension wurde 0,8 mL SOC-Medium hinzugegeben und es folgte eine Inkubation bei 37 °C (200 rpm | 1 h). Nachfolgend wurden zunächst 200 µL der Zellen auf LB-X-Gal-Amp-Selektionsagarplatten ausplattiert. Die verbliebenen Zellen wurden durch Zentrifugation pelletiert (1.000 g | 10 min), 700 µL des Mediums abgenommen und das Pellet im verbliebenen Medium erneut durch vorsichtiges pipettieren gelöst und ebenfalls auf einer Selektionsplatte ausplattiert. Die Anzucht der Kolonien erfolgte ü.N. bei 37 °C im Brutschrank.

## 2.6.9 Klonierungsstrategien

Die Klonierung von DNA-Fragmenten wurde für Sequenzierungen und zur Herstellung von Expressionskonstrukten durchgeführt. Für erfolgreiche Klonierungen ist es notwendig, dass möglichst saubere DNA verwendet wird. Wenn im Anschluss einer PCR auf dem Kontrollgel eine distinkte Bande der erwarteten Größe zu sehen war, so wurde das Produkt mit einem kommerziellen Kit auf Basis von Silica-Membranen nach Herstellerangaben gereinigt.

### 2.6.9.1 Klonierung in den pGEM-T-easy Vektor

Das Einfügen eines *inserts* in den pGEM-T-easy Vektor erfolgte über die TA-Klonierung. Dabei konnte ein PCR-Produkt, welches durch die *Taq*-Polymerase am 3'-Ende ein Adenosin (A) angehängt bekommen hatte, in den bereits linearisierten und mit Thymin (T)-Überhängen

versehenen Vektor ohne den Einsatz einer Ligase kloniert werden. Wenn das *insert* sequenziert werden sollte, wurde eine PCR mit der Phusion-Polymerase durchgeführt. Diese *proofreading*-Polymerase hinterlässt keinen A-Überhang, daher musste vor der Ligation mittels *A-tailing* ein Adenin angehängt werden. Anschließend wurde eine Ligation ü.N. nach Herstellerangaben durchgeführt, am nächsten Tag transformiert und die Kolonien ü.N. bei 37 °C auf LB-Amp-X-Gal-Platten kultiviert. Die Auswahl positiver Kolonien konnte aufgrund der Eigenschaften des pGEM-T-easy Vektors nach der Blau-Weiß-Selektion durchgeführt werden (Kapitel 2.5.2).

**Tabelle 2.22: Zusammensetzung der Reaktion zum A-tailing von PCR-Ansätzen**

Komponente	Volumen [ $\mu\text{L}$ ]
10x-Puffer	2,0
ATP (2 mM)	2,0
gereinigte <i>template</i> -DNA	15,0
<i>Taq</i> -Polymerase (5 U/ $\mu\text{L}$ )	1,0
Add. 20 $\mu\text{L}$ A. <i>Bidest</i>	

### 2.6.9.2 Klonierung in den NEV-N *shuttle*-Vektor

Im Gegensatz zum pGEM-T-easy Vektor ist der NEV-N Vektor geschlossen, daher wurde er, wie auch das *insert*, zuerst mit *NotI* geschnitten und dann dephosphoryliert, um eine Religation zu verhindern. Das *insert* musste vor der Klonierung durch geeignete PCR-Primer von der *NotI* Schnittstelle flankiert werden. Dem *forward*-Primer wurde hinter die *NotI* Schnittstelle noch die 5'UTR-Sequenz des Monosaccharid-Transporters STP1 aus *Arabidopsis thaliana* hinzugefügt um die Expression pflanzlicher Gene in Hefen zu verstärken (Stadler *et al.*, 1995). Das weitere Vorgehen war analog zur Klonierung mit dem pGEM-T-easy Vektor.

### 2.6.10 Gelelektrophorese

Zur Erfolgskontrolle, Auftrennung und Größenbestimmung von DNA-Fragmenten aus PCR-Reaktionen (Kapitel 2.6.5), Plasmidisolierungen und Restriktionshydrolysen (Kapitel 2.6.2), sowie zur Qualitätskontrolle von RNA-Isolierungen (Kapitel 2.6.1) wurden TAE-Agarosegele verwendet. Nach erfolgter Auftrennung wurde das Gel in einem Ethidiumbromid-Bad (1  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ) für 20 min inkubiert und anschließend auf einem UV-Tisch fotografiert.

**Tabelle 2.23: TAE-Puffer für die Gelelektrophorese**

Puffer	Substanz	Konzentration
TAE-Puffer (50x)	Tris	2 M
	Acetat	1 M
	EDTA	50 mM
	pH 8,0	

### 2.6.11 *in-situ*-Hybridisierung

Die mRNA *in-situ*-Hybridisierung erfolgte in Anlehnung an das Protokoll von Karlgren *et al.* (2009). Eine detaillierte Auflistung der verwendeten Puffer, Lösungen und Zusätze befindet sich im Anhang.

#### 2.6.11.1 Sammeln und fixieren des Gewebes

Frisch geerntete Nadeln von *P. abies* wurden in der Mitte durchgeschnitten und sofort in einer 4 %igen Paraformaldehydlösung fixiert. Um sicherzustellen, dass die Fixierlösung auch die Mitte der Gewebestücke erreicht, wurde für 30 min Vakuum angelegt, wobei die Vakuumstärke langsam schrittweise erhöht wurde bis feine Bläschen rundherum aus dem Gewebe an die Oberfläche aufstiegen. Danach wurde das Vakuum langsam schrittweise verringert, die Fixierlösung erneuert und die Nadeln ü.N. bei 4 °C unter leichtem Schwenken inkubiert.

#### 2.6.11.2 Dehydration und Einbettung des Gewebes

Die Schritte der Dehydration am nächsten Tag wurden alle bei 4 °C durchgeführt. Die Nadeln wurden zunächst für 30 min mit einer 0,85 %igen NaCl-Lösung gewaschen und anschließend jeweils für 90 min durch eine Ethanolreihe ansteigender Konzentration (50, 70, 85, 95 und 100 % Ethanol, jeweils inkl. 0,85 % NaCl) dehydriert. Danach wurden die Nadeln ü.N. in 100 % Ethanol mit 0,1 % (w/v) Eosin inkubiert. Die Eosin-Färbung erleichterte im späteren Verlauf das Wiederfinden der Nadeln im Wachs.

Am dritten Tag wurde das überschüssige Eosin mit Ethanol abs. ausgewaschen und die Gewebestücke mit einer 1:1 Ethanol-Histoclear-Lösung gefolgt von 100 % Histoclear für jeweils 1 h auf die Wachseinbettung vorbereitet. Die Gewebestücke wurden abschließend ü.N. in 50 % Histoclear und 50 % Histowachs bei 45 °C inkubiert.

Am vierten Tag wurden die Nadeln in 100 % Histowachs überführt und bei 60 °C für drei Tage inkubiert. Während dieser Zeit wurde die Wachslösung zweimal täglich durch frische ersetzt.

Am siebten Tag ist das Wachs komplett ins Gewebe eingedrungen und die Proben können in Wachsböcke gegossen werden um sie am Mikrotom zu schneiden. Dazu wurde eine kleine Schale mit Wachs befüllt, auf eine 45 °C warme Heizplatte gestellt und die Nadeln senkrecht im Wachs positioniert. Im Anschluss wurde das Wachs bei RT abgekühlt und danach bei 4 °C gelagert.

#### 2.6.11.3 Dünnschnitte am Mikrotom

Um das Gewebe am Mikrotom schneiden zu können, wurden aus dem Wachsböckchen kleine Trapezoeder geschnitten in denen die Nadel senkrecht stand und damit parallel zur Schnittkante. Es wurden Dünnschnitte mit einer Stärke von 8 µm und einem Schnittwinkel von 0-3° angefertigt. Das Wachsband wurde auf die Länge eines Objektträgers (Superfrost Plus, Roth)

zurechtgeschnitten und auf einem mit DEPC-Wasser benetzten Objektträger gelegt. Diese wurden zum Entfalten anschließend auf einer 42 °C warme Heizplatte platziert und nach wenigen min das überschüssige Wasser entfernt. Zum Trocknen wurden die Objektträger ü.N. auf der Wärmeplatte belassen.

#### 2.6.11.4 Vorbereitung der Sonden-Synthese

Für die spätere Sonden-Synthese wurden jeweils Bereiche in der Sequenz der SUT von *P. abies* gewählt, die möglichst spezifisch sind, damit es nicht zu falsch-positiven Signalen aufgrund der Reaktion auf einen anderen SUT kommt. Die SUT bestehen aus 12 Transmembrandomänen (TM), die hoch konservierte Bereiche sind, und einem zentralen *loop* zwischen der 6. und 7. TM. Die Sequenz des *loops* ist variabel und deshalb wurde je SUT-Typ eine Sonde dort abgeleitet und eine weitere über die 6. bis zur 7. TM über den *loop*. Es wurden PCR-Primer designt, die die ausgewählte Sequenz flankieren. Die PCR-Produkte wurden in den pGEM-T-easy Vektor ligiert und anschließend in *E. coli* transformiert. Auf dem Vektor liegt *upstream* der MCS (*multiple cloning site*) ein Promotor für die T7 RNA-Polymerase und *downstream* der MCS für die SP6 RNA-Polymerase, welche für die spätere Sonden-Synthese genutzt werden konnten. Um herauszufinden in welcher Orientierung das *insert* im Vektor liegt, wurden Plasmide aus weißen Kolonien isoliert und sowohl PCR mit einer Kombination aus *insert*- und Vektorspezifischen Primern als auch Sequenzierungen durchgeführt. Es wurden Plasmide gewählt in denen die T7 RNA-Polymerase-Bindestelle am 5'-Anfang des *inserts* liegt.

Vor der eigentlichen Sonden-Synthese wurde pro Sonde eine 3 mL Vorkultur angezogen und damit am nächsten Tag eine 50 mL Hauptkultur angeimpft. Diese Kultur wurde am nächsten Tag geerntet und eine Plasmid-Isolation durchgeführt. Anschließend musste das Plasmid in zwei Ansätzen linearisiert werden, um eine *sense*- und *antisense*-Sonde zu generieren. Eine Restriktion mit *SpeI*, gegenüber der SP6-Bindestelle, für eine *sense*-Sonde und mit *NcoI* für eine *antisense*-Sonde. Es wurden 12 µg Plasmid und 20 U Restriktionsenzym eingesetzt und damit die Hydrolyse vollständig ablaufen konnte, wurde sie ü.N. bei 37 °C durchgeführt. Am folgenden Tag wurde das Enzym durch einen Hitzeschock (30 min, 80 °C) deaktiviert, der Ansatz mit einem Kit nach Herstellerangaben gereinigt und das Ergebnis mit einem Agarosegel kontrolliert.

#### 2.6.11.5 Sonden-Synthese

Der linearisierte Vektor diente als *template* für die RNA-Sonden-Synthese. Je nach dem mit welchem Enzym geschnitten wurde, kam eine andere RNA-Polymerase zum Einsatz. Als Positivkontrolle wurden Sonden mit den qPCR-Primern von Ubiquitin hergestellt. Pro Sonde wurden zwei Ansätze pipettiert.

**Tabelle 2.24: Zusammensetzung der RNA-Transkription für die Sondensynthese**

Komponente	Volumen [ $\mu\text{L}$ ]/Menge
DIG-dNTP-Mix	2,0
T7/SP6-Polymerase	2,0
Transkriptionspuffer	2,0
RNase-Inhibitor	1,0
linearisiertes Plasmid	1 $\mu\text{g}$
Add. 20 $\mu\text{L}$ A. <i>Bidest</i>	

Die Synthese wurde für 2 h bei 37° C durchgeführt. Es wurden je 1  $\mu\text{L}$  (*pre*-DNase) zur späteren Analyse auf einem Agarosegel verwahrt. Im nächsten Schritt wurde das DNA-*template* entfernt, um sicherzustellen, dass nur mit der RNA-Sonde weitergearbeitet wird. Der Transkriptionspuffer enthielt DTT, was die Aktivität der DNase hemmt. Daher wurde dem verbleibenden Ansatz das Vierfache Volumen an DEPC-Wasser zugesetzt um die Konzentration des DTT ausreichend zu verdünnen. Der Verdau-Ansatz wurde unter Zugabe von 5  $\mu\text{L}$  DNase, 45 min bei 37° C inkubiert. Hiervon wurde ebenfalls je 1  $\mu\text{L}$  verwahrt (*post*-DNase) und zusammen mit den *pre*-DNase Proben auf einem Agarosegel analysiert. Der Verdau war erfolgreich, wenn in den *post*-DNase Proben keine Vektorbande mehr zu sehen war. Anschließend wurde die Sonde mit einer Natriumacetat-Extraktion gefällt. Dazu wurde dem Ansatz 1/10 Vol. NaAc (pH 5,2), 2,5 Vol. Ethanol *abs.* sowie 100 mg tRNA hinzugegeben bevor er 30 min bei -80 °C inkubiert wurde. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 4 °C (13.000 g | 30 min). Danach wurde das Pellet zweimal mit 70 %igem Ethanol gewaschen (13.000 g | 10 min) und ein Ansatz in 50  $\mu\text{L}$  50 %igem (v/v) deionisiertem Formamid gelöst und bis zur Verwendung bei -80° C gelagert.

#### *Alkalische Hydrolyse*

Um eine kleinere Sonde zu erhalten, welche besser in das Gewebe eindringen kann, wurde diese mittels alkalischer Hydrolyse nachträglich verkürzt. Hierzu wurde das Pellet des zweiten Ansatzes in 100  $\mu\text{L}$  100 mM Carbonat-Puffer (pH 10,2) gelöst und bei 60 °C inkubiert. Die finale Länge sollte ca. 150 bp betragen und konnte mit folgender Formel berechnet werden:

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

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

Nach Abschluss wurde die Hydrolyse mit 1/20 Vol. 10 %iger (v/v) Essigsäure gestoppt. Anschließend folgte eine Natriumacetat-Präzipitation (s.o.). Der hydrolysierte Ansatz wurde ebenfalls in 50  $\mu\text{L}$  50 %igem (v/v) deionisiertem Formamid gelöst und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

### 2.6.11.6 Hybridisierung der Sonde mit den Gewebeschnitten

#### *Pre-Treatment der Gewebeschnitte*

Für die Hybridisierung wurden die frischen Schnitte vom Vortag verwendet (Kapitel 2.6.11.3). Zuerst wurde das Wachs durch zweimaliges 10-minütiges Waschen in 100 % HistoClear entfernt. Anschließend wurde das Gewebe je 30 s mit einer Ethanol-Reihe absteigender Konzentration rehydriert. Um die Zugänglichkeit des Gewebes für die RNA-Sonde zu verbessern wurde fixiertes Protein durch einen Pronase-Verdau entfernt (37 °C | 20 min). Mit einer 0,2 %igen Glycin-Lösung wurde die Pronase deaktiviert und das Gewebe noch einmal in 4 % Paraformaldehyd refixiert (10 min). Nach zweimaligem Waschen in PBS-Puffer wurden die Objektträger 10 min in eine 1 %ige Essigsäure-Anhydrid-Lösung getaucht um das Verhältnis von Signal zu Hintergrund zu verbessern. Nach zweimaligem Waschen in PBS-Puffer wurde das Gewebe in einer Ethanol-Reihe aufsteigender Konzentration abschließend wieder dehydriert.

#### *Hybridisierung*

Für die eigentliche Hybridisierung wurden Hybridisierungspuffer und Sonde im Verhältnis 4:1 gemischt. Es wurde sowohl hydrolysierte wie nicht-hydrolysierte Sonde verwendet als auch ein Gemisch aus beidem. Wenn zwei Sonden verwendet wurden war das Verhältnis 4:0,5:0,5. Zuvor wurden die Sonden für 2 min bei 80 °C erhitzt, kurz zentrifugiert und sofort auf Eis gestellt. Pro Objektträger wurden insgesamt 40 µL Sondengemisch aufgetragen und vorsichtig mit einem Deckglas abgedeckt um Blasenbildung zu vermeiden. Eine flache Plastikbox wurde mit feuchtem Papier ausgelegt und die Objektträger darin auf einem Ständer platziert. Die Box wurde luftdicht verschlossen und ü.N. bei 50 °C inkubiert.

#### *Antikörper-Färbung*

Am folgenden Tag wurden die Objektträger in warmen SSC-Puffer getaucht um die Deckgläser zu entfernen und für insgesamt 2 h bei 50 °C in SSC-Puffer gewaschen. Dabei wurde der Puffer mehrmals gewechselt. Zur Reduktion des Hintergrundsignals durch unvollständig oder lose gebundene RNA-Sonden wurden die Objektträger zuerst 10 min in NTE-Puffer äquilibriert und anschließend für 30 min in NTE-Puffer mit zugesetzter RNase (20 µg/mL) bei 37 °C inkubiert. Nach der RNase-Behandlung wurden die Objektträger dreimal für je 5 min mit NTE-Puffer gewaschen und anschließend 1 h bei 50 °C in SSC-Puffer inkubiert. Zur Vorbereitung auf die Antikörper-Färbung wurden die Objektträger 5 min in PBS-Puffer und danach 5 min in Puffer 1 inkubiert.

Zur Reduktion des Hintergrundsignals wurden die Objektträger zunächst in eine Plastikbox gelegt, der Boden dünn mit Block-Lösung (Puffer 2) bedeckt und die Box für 30 min auf eine Schüttelplatte gestellt. Im Anschluss wurden die Objektträger in Puffer 3 für 30 min äquilibriert. Nach dieser Phase erfolgte die Antikörper-Färbung und die Objektträger wurden in der

Plastikbox mit dem Anti-DIG-Antikörper (1:1250) in Puffer 4 bedeckt und für 2 h unter leichtem Schütteln im Dunkeln inkubiert.

Danach wurden die Objektträger 80 min in Puffer 3 gewaschen (Puffer wurde mehrmals gewechselt). Um das Signal sichtbar zu machen wurden die Objektträger dünn mit Färberlösung bedeckt und die Box mindestens 16 h aber maximal 72 h im Dunkeln inkubiert.

### *Permanente Einbettung*

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

## 2.7 Verwendete Software

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

**Tabelle 2.25: Verwendete bioinformatische Software und Server**

Name	Version	Funktion	Internetadresse	Referenz
BioEdit	7.2.25	Sequenzalignment und Analyse	<a href="http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html">www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html</a>	Hall, 1999
Blast		Sequenzvergleich	<a href="http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>	Altschul <i>et. al.</i> , 1999
Chromas Pro	1.5	DNA-Sequenzierung	<a href="http://technelysium.com.au/">http://technelysium.com.au/</a>	
Congenie		Datenbank	<a href="http://www.congenie.org">www.congenie.org</a>	Nystedt <i>et. al.</i> , 2013
Expasy		<i>In-silico</i> Translation	<a href="https://web.expasy.org/translate/">https://web.expasy.org/translate/</a>	
Geneious	R9	Primerdesign		Campanella <i>et. al.</i> , 2003
MatGAT	2.01	<i>Similarity</i> -Matrix		
MEGA	6.06	Phylogenetische Analyse	<a href="http://www.megasoftware.net/">www.megasoftware.net/</a>	Tamura <i>et. al.</i> , 2013
MxPro	6.5	qPCR-Auswertung	<a href="http://www.agilent.com">www.agilent.com</a>	
NCBI		Datenbank	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/</a>	
PeakNet	5.1	Zuckeranalyse		
Perl	1.1.21	Primerdesign	<a href="http://perlprimer.sourceforge.net/">http://perlprimer.sourceforge.net/</a>	
Primer				
Primer3	4.1.0	Primerdesign	<a href="http://primer3.ut.ee/">http://primer3.ut.ee/</a>	
PSIPRED		Proteinstrukturanalyse	<a href="http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/">http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/</a>	Buchan und Jones, 2019
TMHMM	2.0	Topografievorhersage	<a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/">www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/</a>	

## **2.8 Statistische Analyse**

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

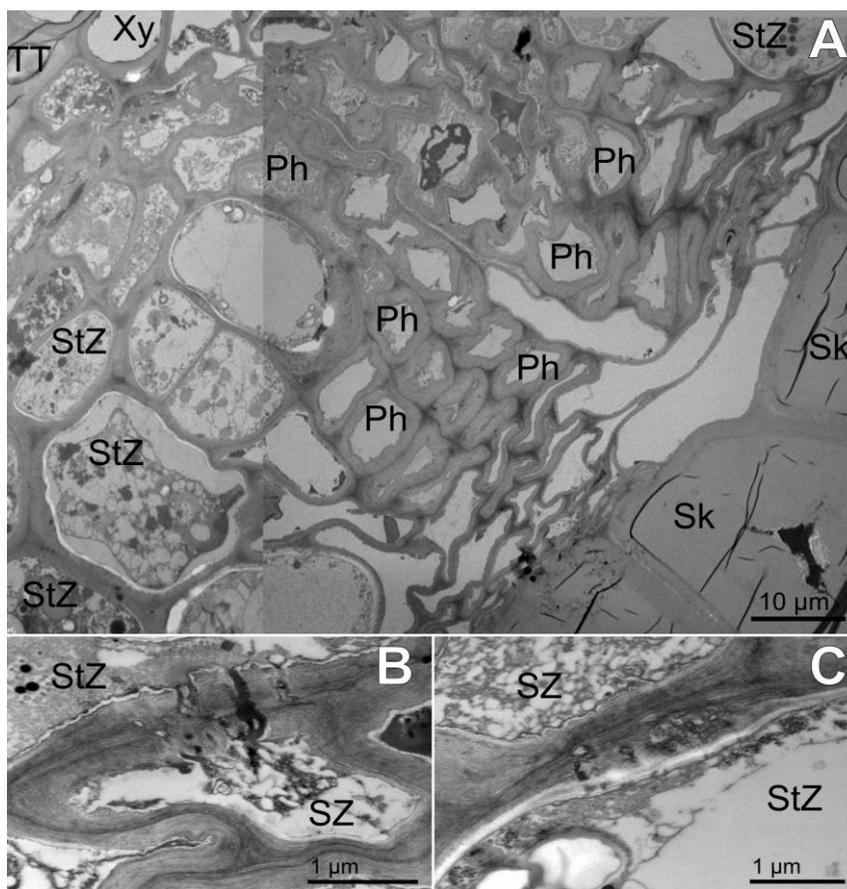
### 3 Ergebnisse

#### 3.1 *Minor vein-* und Leitbündel-Anatomie

Die Analyse der *minor vein* und Leitbündel-Struktur kann Aufschluss über die möglichen Transportwege der Photoassimilate geben. Daher wurden die Struktur der *minor veins* und Leitbündel in den drei Gymnospermen *Picea abies* (*P. abies*), *Ginkgo biloba* (*G. biloba*) und *Gnetum gnemon* (*G. gnemon*), sowie der basalen Angiosperme *Magnolia kobus* (*M. kobus*) anhand transmissions-elektronenmikroskopischer Aufnahmen (TEM) analysiert.

##### 3.1.1 *Picea abies*

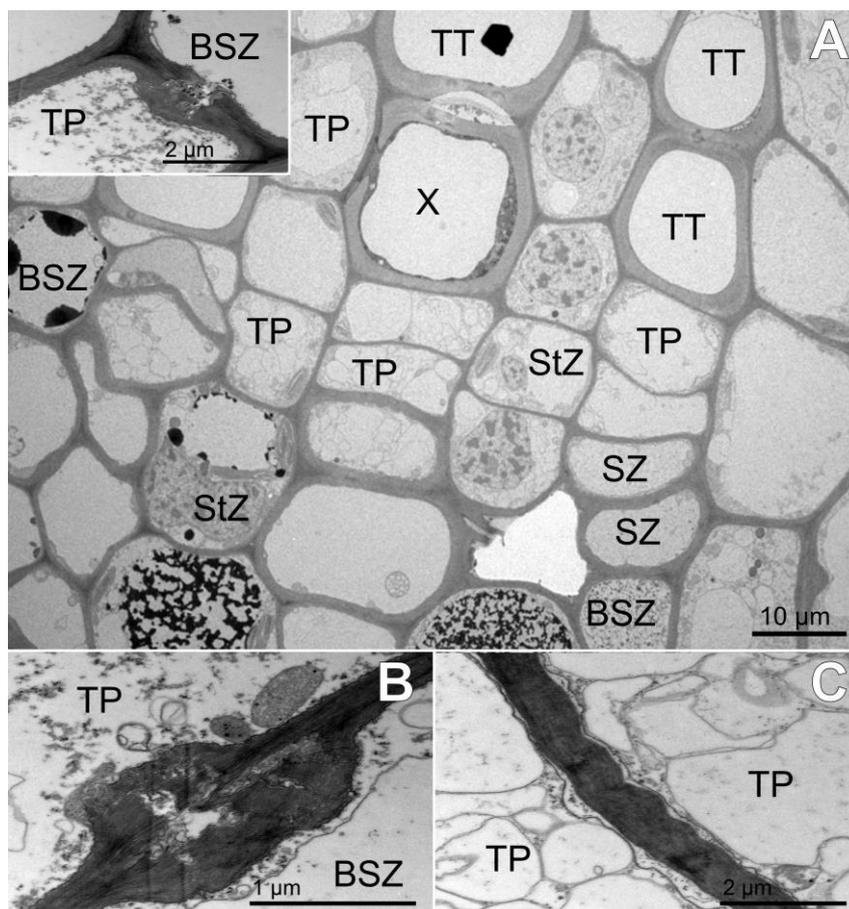
In Abbildung 3.1 A ist ein aus zwei Einzelbildern zusammengesetzter Querschnitt der Nadel im Bereich des Leitbündels zu sehen. Das Phloem ist zur Nadelunterseite hin durch Sklerenchymzellen begrenzt und wird von mehreren Komplexen aus Strasburger-Zellen (StZ) und Siebzellen (SZ) flankiert. Oberhalb sind erste Zellen des Xylems zu erkennen. Die Bildabschnitte B und C zeigen jeweils plasmodesmatische Verbindungen zwischen einer StZ und einer dazugehörigen SZ.



**Abbildung 3.1: TEM-Aufnahmen des Leitbündels von *P. abies*.** A Struktur des Leitbündels. B und C Aufnahmen von Plasmodesmata (PL) zwischen Strasburger-Zelle (StZ) und jeweils dazugehöriger Siebzelle (SZ). Ph: Phloem; Sk: Sklerenchm; TT: Transfusionstracheide; Xy: Xylem.

### 3.1.2 *Ginkgo biloba*

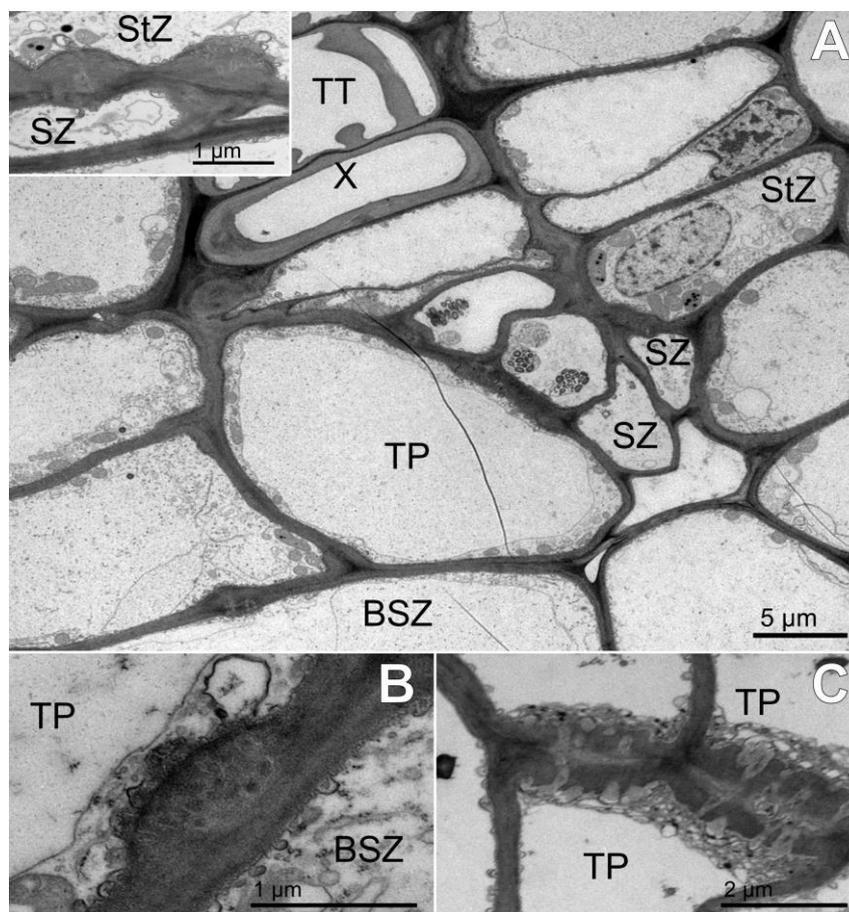
Die Aufnahmen zeigen die Leitbündelregion eines komplett entwickelten Blattes in der Mitte der Vegetationsperiode (Abbildung 3.2 A). Anders als bei den Nadeln von *P. abies*, wo das Gefäßbündel in einem zentralen Strang angeordnet ist, besitzen Ginkgo-Blätter eine dichotome Aderung. Der Ausschnitt A zeigt den für Gymnospermen typischen Aufbau von axialem Xylem und Zellen des Phloems, die von Transfusionsparenchym (TP) umgeben sind. Das TP besitzt zahlreiche plasmodesmatische Verbindungen zu den nach außen liegenden Bündelscheidenzellen (BSZ; Abbildung 3.2 B). Zwischen verschiedenen TP gibt es vereinzelt schwach ausgeprägte Verbindungen über Plasmodesmata (PL) (Abbildung 3.2 C).



**Abbildung 3.2: TEM-Aufnahmen der *minor vein* von *G. biloba*.** A Struktur der *minor vein*. Der Einschub zeigt einen vergrößerten Ausschnitt einer Verbindung zwischen Transfusionsparenchymzelle (TP) und Bündelscheidenzelle (BSZ) über Plasmodesmata (PL). B PL zwischen TP und BSZ. C Aufnahme von PL zwischen benachbarter TP. StZ: Straßburger-Zelle; SZ: Siebzelle; TT: Transfusionsstracheide; X: Axiales-Xylem.

### 3.1.3 *Gnetum gnemon*

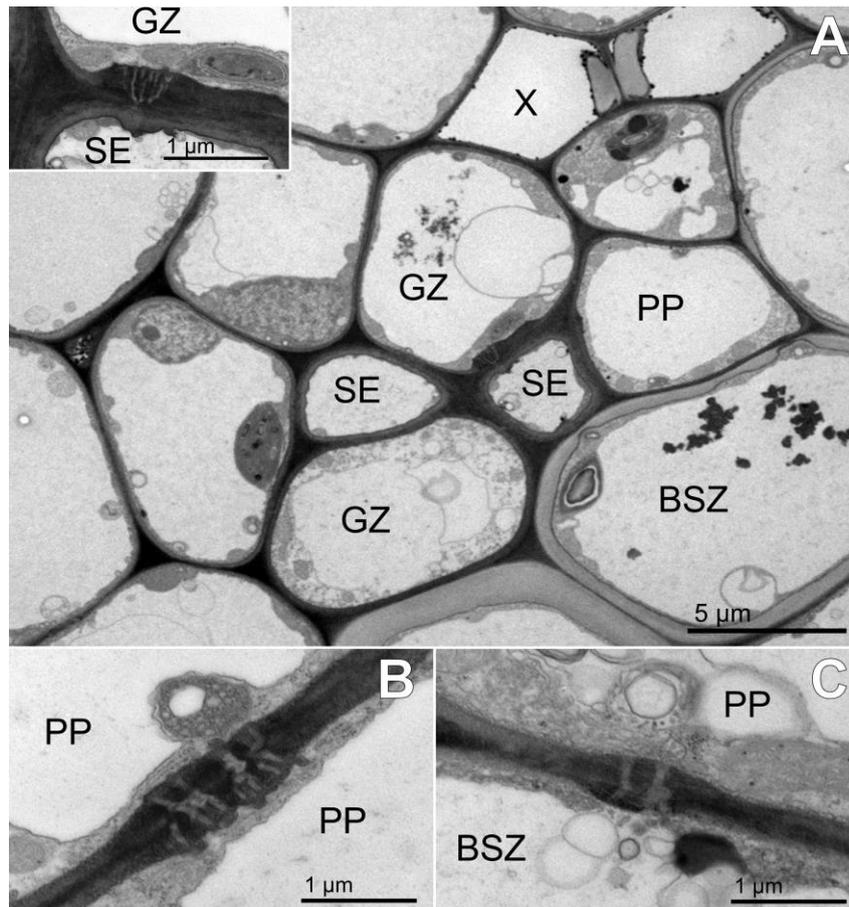
Im Gegensatz zu den meisten anderen Gymnospermen haben *Gnetum*-Blätter eine retikuläre Aderung mit mindestens fünf Blattaderklassen, ähnlich den meisten Dikotyledonen. Es sind zwei SZ zu erkennen. Das axiale Xylem und Elemente des Phloems sind in TP eingebettet und von BSZ umgeben. Somit ähnelt der Aufbau des Leitbündels dem von *G. biloba* sehr stark. Wenn sie nebeneinander liegen, können StZ über PL mit SZ verbunden sein (Abbildung 3.3 A). Durch den Besitz zahlreicher Zellorganellen lassen sich die StZ von anderen Parenchymzellen unterscheiden. Gruppen von PL sind auch zwischen BSZ und TP (Abbildung 3.3 B), sowie zwischen verschiedenen TP zu erkennen (Abbildung 3.3 C). Es scheint, dass die meisten PL von endoplasmatischem Retikulum oder andere Zellbestandteilen durchzogen sind.



**Abbildung 3.3: TEM-Aufnahmen der *minor vein* von *G. gnemon*.** A Struktur der *minor vein*. Der Einschub zeigt einen vergrößerten Ausschnitt einer Verbindung zwischen Strasburger-Zelle (StZ) und Siebzelle (SZ) über Plasmodesmata (PL). B PL zwischen Transfusionsparenchymzelle (TP) und Bündelscheidenzelle (BSZ). C Aufnahme von PL benachbarter TP. TT: Transfusionsstracheide; X: Axiales-Xylem. Abb. aus Fink *et al.*, 2018.

### 3.1.4 *Magnolia kobus*

In der dargestellten *minor vein* von *M. kobus* werden zwei Siebelemente (SE) von GZ und Phloemparenchymzellen (PP) flankiert. Die GZ sind durch PL, welche auf der GZ-Seite stärker verzweigt sind, mit den SE verbunden (Abbildung 3.4 A). Außerdem sind sowohl zwischen verschiedenen PP-Zellen (Abbildung 3.4 B) als auch zwischen BSZ und PP-Zellen PL vorhanden (Abbildung 3.4 C), welche auf beiden Seiten gleichmäßig die zum Teil typischen H-förmigen Verzweigungen aufweisen.



**Abbildung 3.4: TEM-Aufnahmen der *minor vein* von *M. kobus*.** A Struktur der *minor vein*. Der Einschub zeigt einen vergrößerten Ausschnitt einer Verbindung zwischen Siebelement (SE) und Geleitzelle (GZ) über Plasmodesmata (PL). B Symmetrische PL zwischen zwei Phloemparenchymzellen (PP) C Aufnahme von PL zwischen einer PP-Zelle und einer Bündelscheidenzelle (BSZ). X: Xylem. Abb. aus Fink *et al.*, 2018.

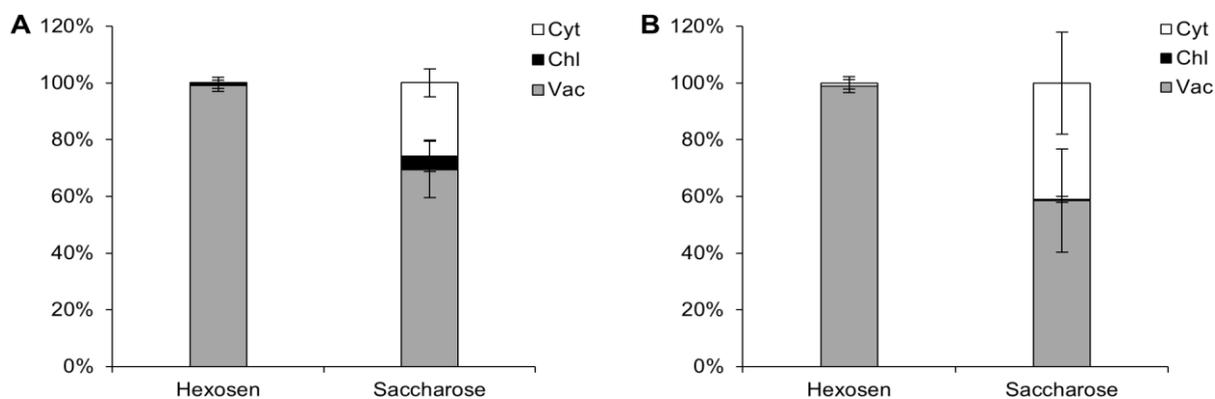
### 3.2 Subzelluläre Verteilung der Zucker

Neben der *minor vein*- und Leitbündel-Anatomie wurde in dieser Arbeit die subzelluläre Verteilung der Zucker analysiert, um weitere Erkenntnisse über den Phloembeladungsmechanismus zu erlangen. Dies erfolgte mittels nicht-wässriger Fraktionierung (NWF). Die NWF bezieht sich auf ein Laubblatt mit einem hohen Anteil an Mesophyllzellen. Während der Fraktionierung müssen Markerenzyme gemessen werden. Beide Voraussetzungen waren nur bei wenigen Baumarten gegeben.

Aufgrund des im Vergleich zu Laubbäumen viel geringeren Verhältnisses von Mesophyllzellen zu den anderen Kompartimenten, konnten für den Nadelbaum *P. abies* keine aussagekräftigen Ergebnisse mit der NWF erzielt werden. Für *G. biloba* konnte eine erfolgreiche Trennung der Kompartimente mittels NWF erreicht werden, allerdings waren die anschließenden enzymatischen Assays nicht erfolgreich. Dies lag vermutlich an dem von Wang *et al.* (2005) beschriebenen hohen Gehalt an Flavonoidglykosiden, Terpenlaktone und polyphenolischen Sekundärmetaboliten. Alle in dieser Arbeit untersuchten Baumarten enthielten primär Saccharose, Glukose und Fruktose. Ihre subzelluläre Verteilung auf die drei verschiedenen Zellkompartimente (Vakuole, Chloroplast und Cytosol) ist für *M. kobus* und *G. gnemon* in Abbildung 3.5 dargestellt.

#### 3.2.1 Subzelluläre Zuckerverteilung in *Gnetum gnemon* und *Magnolia kobus*

Sowohl in *M. kobus* (Abbildung 3.5 A) als auch in *G. gnemon* (Abbildung 3.5 B) waren die Hexosen (Glukose und Fruktose) nahezu ausschließlich in der Vakuole zu finden (ca. 99 %). In der Magnolie verteilte sich die Saccharose zwischen den drei Kompartimenten, wobei sich der Hauptanteil mit 70 % in der Vakuole befand. Knapp 26 % entfielen auf das Cytosol und nur etwa 5 % wurde in den Chloroplasten nachgewiesen. Ein ähnliches Ergebnis zeigt die Verteilung der Zucker bei *G. gnemon*. Dort verteilten sich knapp 60 % der Saccharose auf die Vakuole, etwa 40 % auf das Cytosol und nur ein sehr geringer Teil auf die Chloroplasten.



**Abbildung 3.5: Prozentuale Zuckerverteilung in den subzellulären Kompartimenten von *M. kobus* (A) und *G. gnemon* (B).** Cyt: Cytosol; Chl: Chloroplasten; Vac: Vakuole (n = 3, Mittelwerte ± SD). Abb. aus Fink *et al.*, 2018 (modifiziert).

### 3.2.2 Subzelluläre Volumina

Für weitergehende Untersuchungen zum Phloembeladungs-Mechanismus ist es wichtig, die Zuckerkonzentrationen im Cytosol der Mesophyllzellen und des Phloems zu bestimmen. Dies erfordert eine Bestimmung der jeweiligen Zellvolumina (Tabelle 3.2). Da die hier verwendete Methode der NWF keine Unterscheidung zwischen Cytosol und anderen endomembranen Kompartimenten, wie Mitochondrien, Peroxisomen und endoplasmatisches Retikulum, zulässt, sind diese unter der Bezeichnung Cytoplasma zusammengefasst.

Für die Berechnung der Volumina wurden zunächst die prozentualen Anteile der Kompartimente durch morphometrische Analysen von licht- und elektronenmikroskopischen Aufnahmen bestimmt (Tabelle 3.1). In den beiden untersuchten Arten war die Vakuole das größte Kompartiment und belegte 69,4-76,4 % des Gesamtvolumens, gefolgt von den Chloroplasten mit 11,7-12,0 % und dem Cytoplasma mit 6,6-12,6 %.

**Tabelle 3.1: Relative Volumina der subzellulären Kompartimente von *G. gnemon* und *M. kobus***

Kompartiment/Anteil [%]	<i>G. gnemon</i>	<i>M. kobus</i>
Vakuole	69,4 ± 6,9	76,4 ± 5,3
Chloroplast	12,0 ± 5,9	11,7 ± 2,6
Zellkern	6,0 ± 2,8	5,3 ± 1,8
Cytoplasma	12,6 ± 3,7	6,6 ± 2,1

Das Gesamtvolumen einer Mesophyllzelle wurde als 100 % genommen. Als Cytoplasma wurden Cytosol, Peroxisomen und Mitochondrien zusammengefasst (n = 20-30, Mittelwerte ± SD). Tab. aus Fink *et al.*, 2018 (modifiziert).

Für die abschließende Berechnung der zellulären Volumina wurde der Wassergehalt in beiden Baumarten bestimmt. In den Blättern von *G. gnemon*, mit einem durchschnittlichen Wassergehalt von 640 µL g<sup>-1</sup> FG, konnten folgende Volumina der Kompartimente berechnet werden: Das Volumen der Vakuole betrug 444,1 µL g<sup>-1</sup> FG, das des Stroma 38,4 µL g<sup>-1</sup> FG und das des Cytosols 68,5 µL g<sup>-1</sup> FG. In den Mesophyllzellen der Blätter von *M. kobus*, mit einem durchschnittlichen Wassergehalt von 658 µL g<sup>-1</sup> FG, nahm die Vakuole 502,7 µL g<sup>-1</sup> FG ein, das Stroma 38,4 und das Cytosol 36,9 µL g<sup>-1</sup> FG.

**Tabelle 3.2: Trockengewicht, Wassergehalt und Volumina der subzellulären Kompartimente von *G. gnemon* und *M. kobus***

	<i>G. gnemon</i>	<i>M. kobus</i>
Trockengewicht [mg g <sup>-1</sup> FG]	360,0 ± 6,0	342,0 ± 8,0
Wassergehalt [µL g <sup>-1</sup> FG]	640,0 ± 7,0	658,0 ± 8,0
Vakuole [µL g <sup>-1</sup> FG]	444,1	502,7
Stroma [µL g <sup>-1</sup> FG]	38,4	38,4
Cytosol [µL g <sup>-1</sup> FG]	68,5	36,9

Die subzellulären Volumina wurden ausgehend der relativen Volumina aus Tab. 3.1 berechnet. Trockengewicht und Wassergehalt (n = 5, Mittelwerte ± SD). Tab. aus Fink *et al.*, 2018 (modifiziert).

### 3.2.3 Subzelluläre Zuckerkonzentrationen

Aus der subzellulären Verteilung der Zucker und der subzellulären Volumina konnten die entsprechenden Metabolit-Konzentrationen in den subzellulären Kompartimenten berechnet werden (Tabelle 3.3). Die höchsten Konzentrationen an Glukose und Fruktose wurden in der Vakuole (72,9-86,6 mM) gefunden, während im Cytosol oder Stroma nur geringe Spuren nachgewiesen werden konnten. Die Saccharose-Konzentrationen im Cytosol lag bei 74,8-132,5 mM und in der Vakuole bei 79,4-81,6 mM, während im Stroma keine Saccharose nachgewiesen werden konnte.

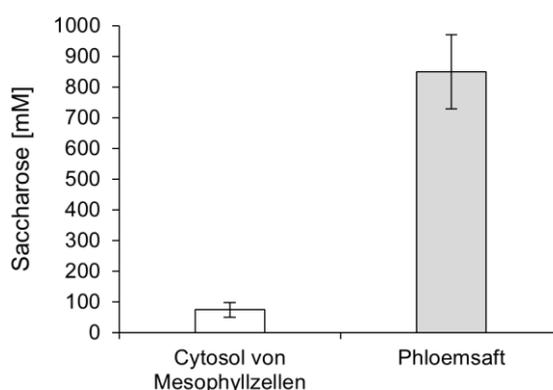
**Tabelle 3.3: Zuckerkonzentrationen in Vakuole, Stroma und Cytosol der Blätter von *G. gnemon* und *M. kobus***

	Zuckergehalt gesamt [ $\mu\text{mol g}^{-1}$ FG]	Konzentration [mM]		
		Vakuole	Stroma	Cytosol
<i>G. gnemon</i>				
Glukose und Fruktose	19,8 ± 4,0	86,6 ± 17,9	0,0 ± 0,0	1,0 ± 2,0
Saccharose	30,9 ± 4,8	81,6 ± 33,6	0,0 ± 0,0	132,5 ± 40,7
<i>M. kobus</i>				
Glukose und Fruktose	16,7 ± 3,2	72,9 ± 14,2	1,4 ± 2,8	0,0 ± 0,0
Saccharose	26,2 ± 3,9	79,4 ± 11,7	0,0 ± 0,0	74,8 ± 24,4

Die Berechnung basiert auf der Zuckerverteilung aus Abb. 3.5, den subzellulären Volumina aus Tab. 3.2 und dem Zuckergehalt im Blatt (Mittelwerte ± SD). Tab. aus Fink *et al.*, 2018 (modifiziert).

### 3.2.4 Saccharose-Gradient zwischen Phloem und Cytosol in *M. kobus*

Ein Vergleich zwischen den Zuckerkonzentrationen im Cytosol von Mesophyllzellen und dem Phloem ermöglichte die Bestimmung eines Konzentrationsgradienten. Die in diesem Zusammenhang gewonnenen Daten sind in Abbildung 3.6 dargestellt.



**Abbildung 3.6: Saccharose-Konzentration im Cytosol von Mesophyllzellen und im Phloemsaft in den Blättern von *M. kobus*.** n = 3, Mittelwerte ± SD. Abb. aus Fink *et al.*, 2018 (modifiziert).

Reiner Phloemsaft konnte aus *M. kobus* mit Hilfe der Laser-Aphid-Stylet-Technik (Kapitel 2.3.3) gewonnen werden. Für die in dieser Arbeit ebenfalls untersuchten Gymnospermen war die Methode bisher nicht erfolgreich. Saccharose war der Hauptzucker im

Phloemsaft von *M. kobus*. Im Phloem wurden keine oder nur geringe Spuren von Glukose und Fruktose detektiert (Daten nicht gezeigt). Die Saccharose-Konzentration im Phloemsaft lag bei 850 mM, während sie im Cytosol nur 75 mM betrug. Daraus ergab sich ein mehr als 11-fach erhöhter Saccharose-Gradient zwischen dem Cytosol der Mesophyllzellen und dem Phloem.

### 3.3 Identifizierte Saccharose-Transporter-Sequenzen

Es konnten insgesamt acht Saccharose-Transporter (SUT)-Sequenzen identifiziert werden (Tabelle 3.4). Dabei handelt es sich um zwei komplette Sequenzen aus dem Nadelbaum *P. abies* (*PaSUT1* und *PaSUT2*). Diese Sequenzen stammen aus der Datenbank *congenie.org* (Nystedt *et al.*, 2013). Dazu wurde diese mit den durch degenerierte Primer erhaltenen Teilstücken durchsucht und mit den gefundenen Sequenzen für *PaSUT1* und *PaSUT2* die Teilstücke vervollständigt. Die Sequenzen wurden anschließend experimentell durch eine PCR mit einer *proof-reading* Polymerase nachgewiesen und mittels Sequenzierung überprüft. Die Benennung der Transporter erfolgte nach ihren Homologen in *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*).

**Tabelle 3.4: Liste der identifizierten SUT der untersuchten Baumarten**

Spezies	Name	Länge [AS]	Zugriffsnummer*
<i>P. abies</i>	<i>PaSUT1</i>	516	MH281472
	<i>PaSUT2</i>	595	MH281473
<i>G. biloba</i>	<i>GbSUT1</i>	524	MH650993
	<i>GbSUT2</i>	591	MH650994
	<i>GbSUT4</i>	552	MH650995
<i>G. gnemon</i>	<i>GgSUT2</i>	326	-
<i>M. kobus</i>	<i>MkSUT2</i>	326	-
	<i>MkSUT4</i>	250	-

\* Zugriffsnummer für die Datenbank <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Tab. aus Dobbelstein *et al.*, 2018 (modifiziert).

Des Weiteren wurden drei weitere vollständige SUT-Sequenzen aus *G. biloba* identifiziert (*GbSUT1*, *GbSUT2* und *GbSUT4*). Bei diesen Sequenzen handelte es sich zunächst um durch RACE (Kapitel 2.6.6) vervollständigte Teilsequenzen, welche später mit der Genomdatei von *G. biloba* (Guan *et al.*, 2016) abgeglichen werden konnten. Im Anschluss wurden sie analog zu den Sequenzen aus *P. abies* nachgewiesen und überprüft. Neben den zuvor beschriebenen fünf vollständigen SUT-Sequenzen, wurden drei partielle Sequenzen gefunden. Zum einen eine Teilsequenz in der Gymnosperme *G. gnemon* (*GgSUT2*), sowie zwei Teilsequenzen in der basalen Angiosperme *M. kobus* (*MkSUT2* und *MkSUT4*; Tabelle 3.4).

Wie in Tabelle 3.5 dargestellt, ergab die Aminosäure-Sequenzanalyse, dass die Ähnlichkeit innerhalb eines gegebenen SUT-Typs (75-92 %) höher ist, als zwischen verschiedenen SUT-Typen (66-78 %). Die Ähnlichkeiten sind innerhalb der Gymnospermen (86-92 %) oder der Angiospermen (85-90 %) noch höher als zwischen beiden Pflanzengruppen (75-86 %).

**Tabelle 3.5: Prozentsatz der identischen und ähnlichen Aminosäuren der identifizierten SUT aus *P. abies* und *G. biloba***

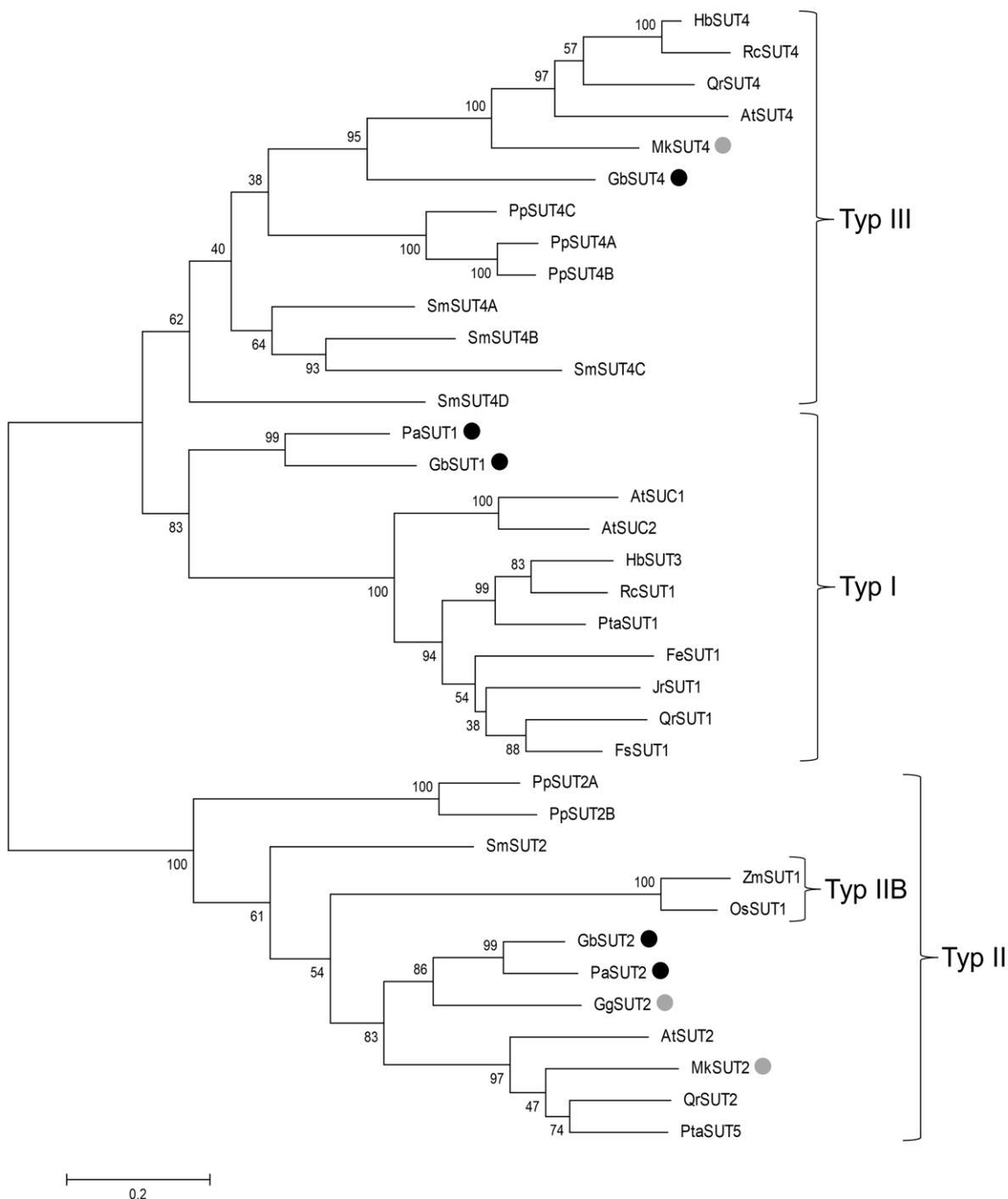
		Ähnlichkeit [%]											
		Typ I					Typ II				Typ III		
		Pa SUT1	Gb SUT1	Qr SUT1	Fs SUT1	Jr SUT1	Pa SUT2	Gb SUT2	Qr SUT2	Pta SUT5	Gb SUT4	Qr SUT4	Pta SUT4
Identität [%]	<b>PaSUT1</b>	-	86,0	74,8	75,9	76,5	71,5	71,2	71,3	71,8	77,8	73,9	73,7
	<b>GbSUT1</b>	73,8	-	74,6	75,6	78,6	73,1	73,0	71,5	70,0	77,2	75,6	73,9
	QrSUT1	58,9	58,4	-	87,8	84,6	67,0	66,7	66,3	66,7	69,0	74,0	72,4
	FsSUT1	59,8	60,6	79,6	-	88,3	69,2	68,8	68,6	68,2	72,1	75,9	75,0
	JrSUT1	59,1	59,4	74,5	79,3	-	67,8	68,8	68,2	68,8	72,1	72,7	72,7
	<b>PaSUT2</b>	51,3	49,6	47,0	48,7	46,9	-	92,1	85,9	85,9	72,5	68,4	69,0
	<b>GbSUT2</b>	52,1	50,1	47,3	48,5	47,1	85,0	-	85,5	86,3	72	67,7	67,5
	QrSUT2	49,4	49,0	45,8	47,9	47,4	70,5	70,1	-	90,1	70,7	67,4	66,9
	PtaSUT5	50,0	48,1	45,3	47,6	46,3	71,4	71,6	80,7	-	72,4	68,2	67,3
	<b>GbSUT4</b>	60,7	57,4	53,7	54,9	54,1	52,2	52,7	50,1	51,8	-	78,0	76,0
	QrSUT4	57,6	57,5	55,8	58,1	55,3	48,5	48,7	48,1	50,2	63,3	-	90,2
	PtaSUT4	56,3	55,3	54,1	57,3	54,9	49,0	48,5	47,7	48,3	57,7	77,8	-

Prozentsatz der identischen und ähnlichen Aminosäuren der identifizierten SUT aus *P. abies* (PaSUT1, PaSUT2) und *G. biloba* (GbSUT1, GbSUT2, GbSUT4), sowie einiger anderer SUT (QrSUT1, QrSUT2, QrSUT4, *Quercus robur*, AHB33871, MH281474, MH650991; JrSUT1, *Juglans regia*, AAU11810; PtaSUT4 und PtaSUT5, *Populus tremula x alba*, ADW94617, ADW94618). Die variablen N- und C-terminalen Enden wurden entfernt und der Sequenzvergleich mit MatGAT 2.01 durchgeführt (Campanella *et al.*, 2003). SUT-Sequenzen aus dieser Arbeit sind fett gedruckt.

### 3.3.1 Phylogenetische Analyse

Für die nachfolgend dargestellten Ergebnisse wurde die Einteilung in vier Gruppen (I, II, IIB und III) nach der Studie von Peng *et al.* (2014) vorgenommen. Die Benennung der in dieser Arbeit identifizierten SUT erfolgte hingegen nach ihren Homologen in *A. thaliana*, da die SUT-Gene, historisch gesehen, in der Reihenfolge ihrer Identifizierung benannt wurden.

Wie in Abbildung 3.7 zu erkennen ist, bilden sich innerhalb einer Typ-Gruppe Subcluster verwandter Arten. Die beiden SUT1 aus *P. abies* und *G. biloba* bilden, genau wie die SUT aus *A. thaliana*, dem Laubmoos *Physcomitrella patens* (*P. patens*) und dem Moosfarn *Selaginella moellendorffii* (*S. moellendorffii*), innerhalb der Typ I-SUT eigene Cluster. Ein ähnliches Bild zeigt sich auch für die SUT des Typs II, wo sich die SUT2 der Gymnospermen *P. abies*, *G. biloba* und *G. gnetum*, sowie der basalen Angiosperme *M. kobus* jeweils in eigene Cluster eingruppierten. Die SUT4 aus *G. biloba* und *M. kobus* ordnen sich den Typ III-SUT zu, bei denen eigene Cluster von den Homologen aus *P. patens* und *S. moellendorffii* gebildet werden.



**Abbildung 3.7: Phylogenetische Analyse von Saccharose-Transportern.** Das Proteinalignment wurde mit ClustalW erstellt, das im Programm MEGA 6.06 implementiert ist. Der Stammbaum wurde als *maximum-likelihood*-Modell mit 1000 *bootstrap*-Wiederholungen mit MEGA 6.06 erstellt (Tamura *et al.*, 2013). Der Maßstab gibt die evolutionäre Distanz wieder und die Zahlen an den Knotenpunkten zeigen in Prozent die Häufigkeit der jeweiligen Abzweigung innerhalb der *bootstrap*-Durchgänge an. Die in dieser Arbeit identifizierten partiellen SUT-Sequenzen sind mit grauen, die vollständigen Sequenzen mit schwarzen Kreisen markiert. Eine Liste mit allen verwendeten SUT-Sequenzen befindet sich im Anhang. At: *Arabidopsis thaliana*; Fe: *Fraxinus excelsior*; Fs: *Fagus sylvatica*; Gb: *Ginkgo biloba*; Gg: *Gnetum gnemon*; Hb: *Hevea brasiliensis*; Jr: *Juglans regia*; Mk: *Magnolia kobus*; Os: *Oryza sativa*; Pa: *Picea abies*; Pp: *Physcomitrella patens*; Pta: *Populus tremula x alba*; Qr: *Quercus robur*; Rc: *Ricinus communis*; Sm: *Selaginella moellendorffii*; Zm: *Zea mays*.

### 3.3.2 Funktions-Charakterisierung

Neben der bioinformatischen und phylogenetischen Analyse der Gymnospermen-SUT, sollte eine biochemische Charakterisierung mittels Hefe-Komplementation in Zusammenarbeit mit Dr. Klebl (AG Molekulare Pflanzenphysiologie, Universität Erlangen-Nürnberg) erfolgen.

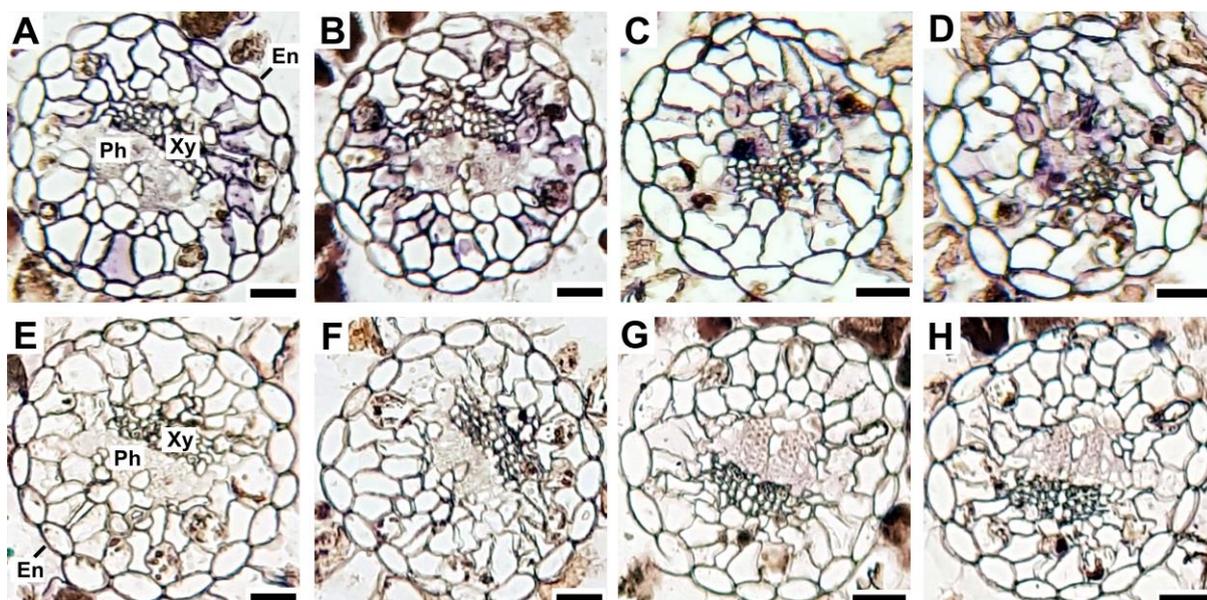
Dazu wurden die SUT-Sequenzen wie in Kapitel 2.6.9.2 beschrieben vorbereitet und in den *Saccharomyces cerevisiae*-Stamm CSY4000 (Rottman *et al.*, 2016) transformiert. Die Aufnahmetests mit <sup>14</sup>C-Saccharose wurden wie bei Sauer und Stadler (1993) beschrieben durchgeführt. Beim ersten Aufnahmetest für die beiden SUT aus *P. abies* (PaSUT1 und PaSUT2) und die drei SUT aus *G. biloba* (GbSUT1, GbSUT2 und GbSUT4) kam es zu keiner Saccharose-Aufnahme. Obwohl die Aufnahmetests ein weiteres Mal mit von Beginn an neu klonierten Sequenzen durchgeführt wurden, kam es erneut zu keiner Aufnahme von Saccharose in die Hefe (Daten nicht gezeigt).

### 3.4 Lokalisation von *PaSUT1* und *PaSUT2*

Die Lokalisation der mRNA der beiden SUT aus *P. abies* erfolgte durch die *in-situ*-Hybridisierung im Leitbündel der Nadeln, welche in der Jahresmitte geerntet wurden (Kapitel 2.6.11). Als Positivkontrolle wurde Ubiquitin verwendet, welches bereits erfolgreich in den qPCR-Experimenten eingesetzt wurde (Dobbelstein *et al.*, 2018; Kapitel 2.6.7).

Der anti-DIG-Antikörper zeigte nach 72 stündiger Inkubation mit der jeweiligen *antisense*-Sonde für beide SUT von *P. abies* ein Signal, welches durch eine Violett-Färbung in den betreffenden Regionen erkennbar wurde. In Abbildung 3.8 A und B ist zu erkennen, dass *PaSUT1* eine Färbung in einigen der Transfusionsparenchymzellen rund um Phloem und Xylem zeigte.

Bei *PaSUT2* wurde stattdessen eine stärkere lokale Violett -Färbung im Bereich des Phloems sichtbar (Abbildung 3.8 C, D). Die Negativkontrollen für beide SUT ließen kein Signal erkennen (Abbildung 3.8 E bis H).



**Abbildung 3.8:** *In-situ* mRNA-Hybridisierung von *PaSUT1* und *PaSUT2* in Leitbündel-Querschnitten der Nadeln von *P. abies*. **A** und **B** zeigen die Schnitte, die mit der *PaSUT1*-antisense-Sonde hybridisiert wurden und **C** und **D** die, die mit der *PaSUT2*-antisense-Sonde hybridisiert wurden. Regionen, welche die entsprechenden SUT exprimierten sind violett angefärbt. *PaSUT1* zeigte eine erhöhte Expression in den das Phloem (Ph) und Xylem (Xy) umgebenden Transfusionsparenchymzellen (**A**, **B**). *PaSUT2* hingegen zeigte eine erhöhte Expression im Bereich des Phloems (**C**, **D**). Die Schnitte **E** bis **H** zeigen die entsprechenden Negativkontrollen, die mit der jeweiligen *sense*-Sonde hybridisiert wurden. En: Endodermis; die Balken entsprechen 25 µm.

### 3.5 Jahreszeitliche Änderung des NSC-Gehalts und der SUT-Expression

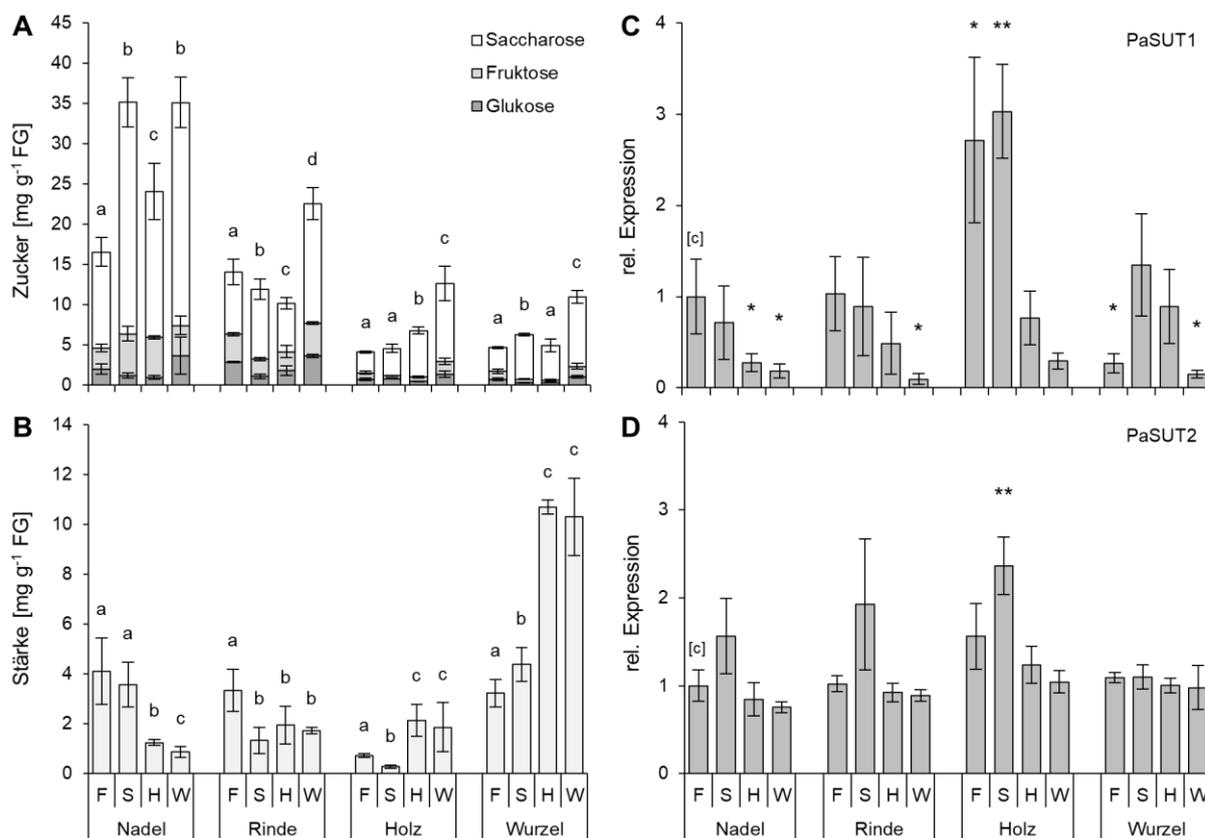
*Source*-Gewebe produzieren eine Vielzahl von nicht-strukturellen Kohlenhydraten (NSC), hauptsächlich Stärke und lösliche Zucker. Diese werden über das Phloem zu den *sink*-Gewebe transportiert. Bei holzigen Pflanzen können sich die Funktionen der verschiedenen Gewebe über die Jahreszeiten hinweg ändern.

Daher wurde der Einfluss von Jahreszeiten auf die Expression von SUT-mRNA und der Gehalt an Zucker und Stärke analysiert. Die Expression ist relativ zum Kalibrator angegeben. Als Kalibrator wurden die Blattproben im Frühjahr ausgewählt und das gemessene Expressionsniveau auf eins normiert.

#### 3.5.1 *Picea abies*

Im immergrünen Nadelbaum *P. abies* war hauptsächlich Glukose, Fruktose und Saccharose vorhanden. Der höchste Zuckergehalt bei *P. abies* wurde in den Nadeln gemessen, dessen Hauptanteil Saccharose war. Im Frühjahr betrug die Gesamtzuckerkonzentration etwa 17 mg g<sup>-1</sup> FG und stieg in der folgenden Jahreszeit um das Zweifache an (Abbildung 3.9 A). Die zweithöchsten Zuckergehalte wurden in der Rinde gemessen, gefolgt von Holz und Wurzel.

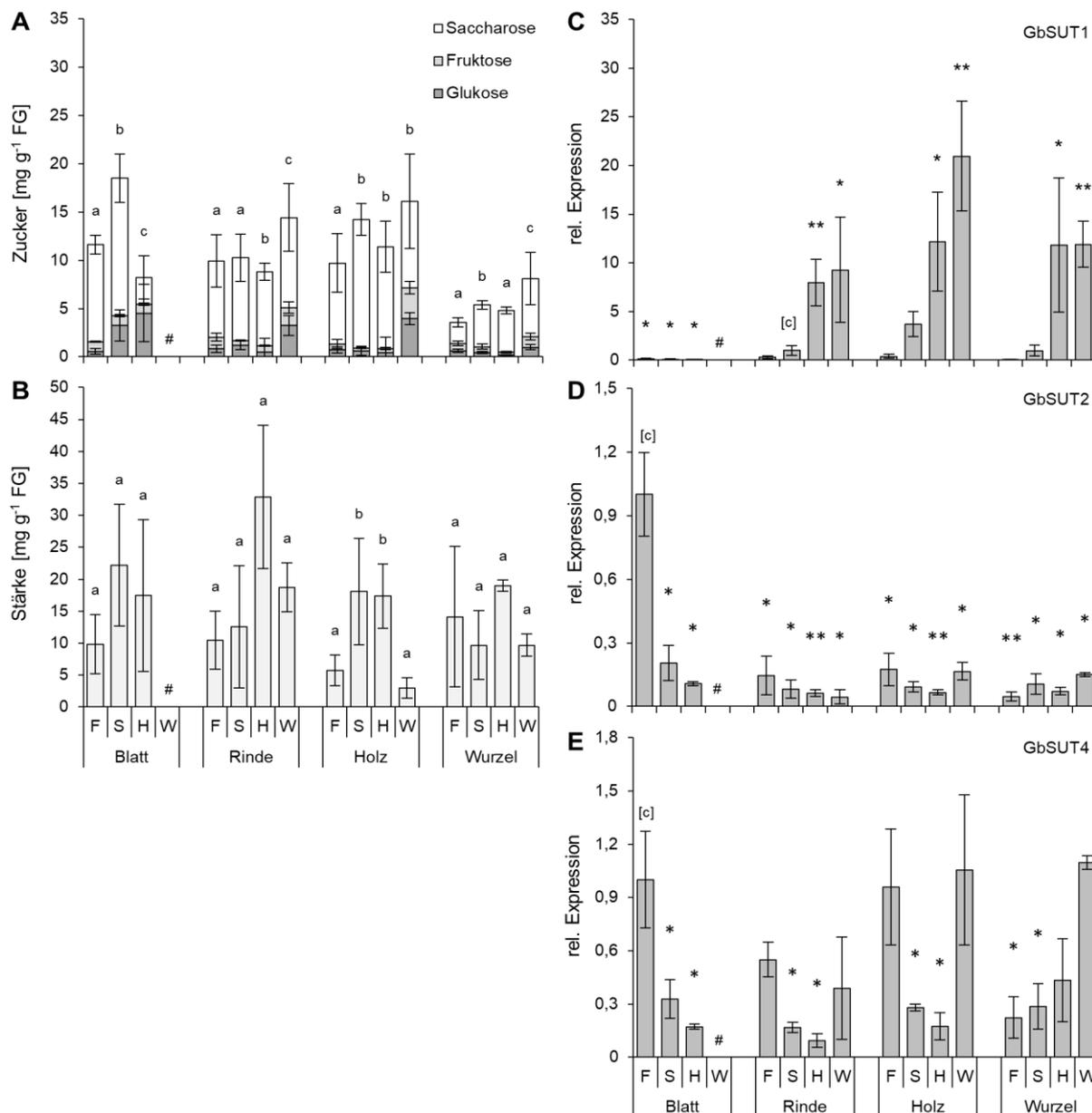
Der höchste Zuckergehalt in allen Geweben wurde in den Nadeln im Winter ermittelt (35 mg g<sup>-1</sup> FG). In allen Jahreszeiten war der Gehalt an Saccharose höher als der der Hexosen. Mit 11 mg g<sup>-1</sup> FG wurde der höchste Stärkegehalt in der zweiten Jahreshälfte in den Wurzeln gemessen (Abbildung 3.9 B). Der Stärkegehalt im Holz hatte ebenfalls im Herbst und Winter sein Maximum, während Nadeln im Frühjahr und Sommer die höchste Stärkemenge aufwiesen. Die Expression von *PaSUT1* und *PaSUT2* wurde in verschiedenen Geweben über das gesamte Jahr gemessen. Das Expressionslevel von *PaSUT1* war in der ersten Jahreshälfte in der Nadel, der Rinde und insbesondere im Holz erhöht (Abbildung 3.9 C). In den Wurzeln war die *PaSUT1*-Expression im Sommer und Herbst am höchsten, auf einem mit dem Kalibrator vergleichbarem Niveau. Im Gegensatz zu *PaSUT1* variierte die Expression von *PaSUT2* nicht so stark zwischen den verschiedenen Geweben über die Jahreszeiten hinweg (Abbildung 3.9 D). Nur im Sommer kam es zu einem leichten Anstieg des Expressionslevels in den Nadeln, der Rinde und dem Holz.



**Abbildung 3.9: Veränderung des Zucker- und Stärkegehaltes sowie der SUT-Expression verschiedener Organe von *P. abies* über den Zeitraum eines Jahres.** **A** Organspezifische Verteilung der Zucker. **B** Organspezifische Verteilung von Stärke. Die verschiedenen Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede in Stärke- und Gesamtzuckergehalt innerhalb eines Organs (Tukey's HSD;  $p \leq 0,05$ ). **C** und **D** Expression von *PaSUT1* und *PaSUT2* relativ zum Kalibrator [c] gemessen. Mit dem T-Test wurde auf signifikante Unterschiede im Vergleich zum Kalibrator getestet (\* =  $p \leq 0,05$ ; \*\* =  $p \leq 0,01$ ; \*\*\* =  $p \leq 0,001$ ). Die Messungen wurden ein zweites Jahr wiederholt und zeigten einen ähnlichen Verlauf (n = 3, Mittelwerte  $\pm$  SD). F: Frühling; S: Sommer; H: Herbst; W: Winter. Abb. aus Döbelstein *et al.*, 2018 (modifiziert).

### 3.5.2 *Ginkgo biloba*

Die dominierenden löslichen Zucker im sommergrünen Baum *G. biloba* waren Glukose, Fruktose und Saccharose. Der Gesamtzuckergehalt in den Blättern lag zwischen 8-18 mg g<sup>-1</sup> FG, wobei Saccharose im Frühjahr und Sommer hierbei den größten Anteil einnahm (Abbildung 3.10 A). Ein erhöhter Gehalt an Hexosen (60 %) konnte nur in den Herbstblättern gemessen werden.

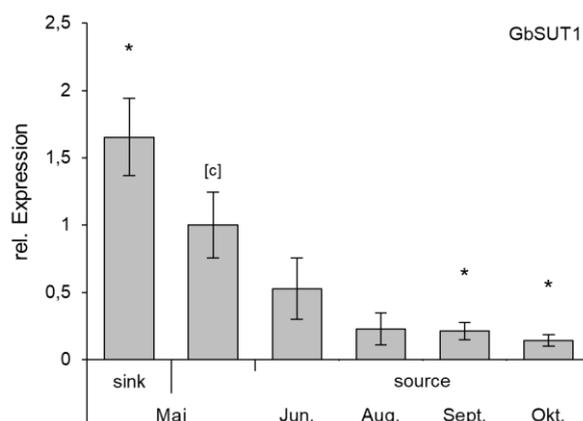


**Abbildung 3.10: Veränderung des Zucker- und Stärkegehaltes sowie der SUT-Expression verschiedener Organe von *G. biloba* über den Zeitraum eines Jahres.** **A** Organspezifische Verteilung der Zucker. **B** Organspezifische Verteilung von Stärke. Die verschiedenen Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede in Stärke- und Gesamtzuckergehalt innerhalb eines Organs (Tukey's HSD;  $p \leq 0,05$ ). **C**, **D** und **E** Expression von *GbSUT1*, *GbSUT2* und *GbSUT4* relativ zum Kalibrator [c] gemessen. Mit dem T-Test wurde auf signifikante Unterschiede im Vergleich zum Kalibrator getestet (\* =  $p \leq 0,05$ ; \*\* =  $p \leq 0,01$ ; \*\*\* =  $p \leq 0,001$ ). Die Messungen wurden ein zweites Jahr wiederholt und zeigten einen ähnlichen Verlauf (n = 3, Mittelwerte  $\pm$  SD). F: Frühling; S: Sommer; H: Herbst; W: Winter; #: keine Blätter im Winter.

Über das ganze Jahr gesehen waren die Gesamtzuckerhalte in der Rinde und dem Holz vergleichsweise hoch und zeigten die Maximalwerte jeweils im Winter. Der Anstieg ist vor allem auf höhere Gehalte an Glukose und Fruktose zurückzuführen. Ein ähnliches Bild zeigte sich in der Wurzel, wobei der Gesamtzuckergehalt vergleichsweise niedriger lag.

Der höchste Stärkegehalt konnte mit  $33 \text{ mg g}^{-1}$  FG in der Rinde im Herbst gemessen werden (Abbildung 3.10 B). Insgesamt war der Verlauf des Stärkegehaltes mit einem Anstieg vom Frühjahr zum Herbst hin und einem Absinken im Winter in allen Organen ähnlich.

Das Expressionslevel von *GbSUT1* lag in den Blättern deutlich unter dem der anderen Organe (Abbildung 3.10 C) und sank im Jahresverlauf stark ab (Abbildung 3.11). Die Expression in den *sink*-Blättern war am höchsten und lag mehr als das 1,5-fache über der des Kalibrators. Dies konnte weder bei den beiden weiteren SUT aus *G. biloba*, noch bei den anderen in dieser Arbeit untersuchten SUT beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

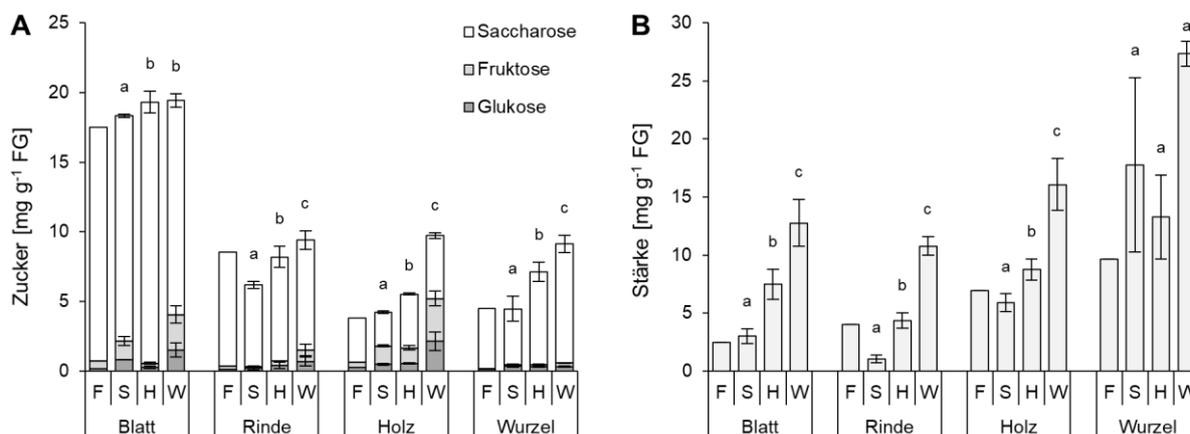


**Abbildung 3.11: Jahresverlauf der Expression von *GbSUT1* in *sink*- und *source*-Blättern.** Expression von *GbSUT1* relativ zum Kalibrator [c] gemessen. Mit dem T-Test wurde auf signifikante Unterschiede im Vergleich zum Kalibrator getestet (\* =  $p \leq 0,05$ ; \*\* =  $p \leq 0,01$ ; \*\*\* =  $p \leq 0,001$ ). Die Messungen wurden ein zweites Jahr wiederholt und zeigten einen ähnlichen Verlauf ( $n = 3$ , Mittelwerte  $\pm$  SD).

Die Expression von *GbSUT2* und *GbSUT4* sank in den Blättern im Verlauf des Jahres ebenfalls stark ab (Abbildung 3.10 D, E). In der Rinde, dem Holz und der Wurzel wurde *GbSUT2* nahezu auf konstantem Niveau exprimiert (Abbildung 3.10 D). Die Expression von *GbSUT4* in der Rinde und im Holz war im Frühjahr und im Winter am höchsten. In der Wurzel stieg die Expression vom Frühjahr zum Winter an.

### 3.5.3 *Gnetum gnemon*

*G. gnemon* ist ein immergrüner tropischer Baum, der das ganze Jahr im geschlossenen Gewächshaus unter ähnlichen Bedingungen mit Temperaturen über 20 °C und genügend Feuchtigkeit gehalten wurde.



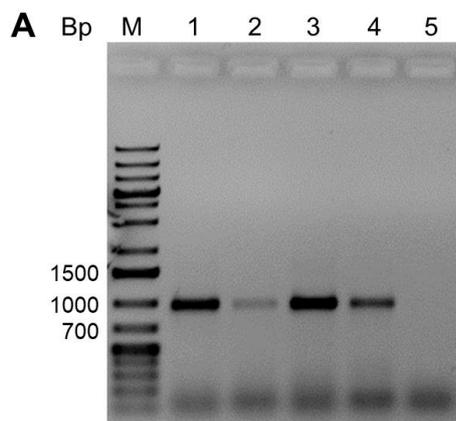
**Abbildung 3.12: Veränderung des Zucker- und Stärkegehaltes verschiedener Organe von *G. gnemon* über den Zeitraum eines Jahres.** **A** Organspezifische Verteilung der Zucker. **B** Organspezifische Verteilung von Stärke. Die verschiedenen Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede in Stärke- und Gesamtzuckergehalt innerhalb eines Organs (Tukey's HSD;  $p \leq 0,05$ ).  $n = 3$ , Mittelwerte  $\pm$  SD. F: Frühling; S: Sommer; H: Herbst; W: Winter.

Der Gesamtzuckergehalt war in den Blättern über das ganze Jahr höher als in den anderen Organen und lag zwischen 17-20 mg g<sup>-1</sup> FG, wobei Saccharose der dominierende Zucker war (70-95 %; Abbildung 3.12 A). Der Verlauf des Gesamtzuckergehaltes in Holz und Wurzel war sehr ähnlich und stieg vom Frühjahr bis zum Ende des Jahres stetig an. Im Holz ist der Anstieg im Winter vor allem auf höhere Gehalte an Glukose und Fruktose zurückzuführen, sodass die Hexosen dort knapp 50 % des Zuckers ausmachten. Im Winter war der Zuckergehalt in allen untersuchten Organen am höchsten.

Abbildung 3.12 B zeigt die Veränderung des Stärkegehaltes der verschiedenen Organe im Verlauf eines Jahres. Der höchste Stärkegehalt betrug 27 mg g<sup>-1</sup> FG und wurde im Winter in der Wurzel gemessen und zeigt keine signifikante Veränderung im Jahresverlauf. In den übrigen drei Pflanzenorganen stieg der Stärkegehalt von Sommer bis Winter bis zu einem Wert um 9 mg g<sup>-1</sup> FG kontinuierlich an.

Da weder in der Literatur geeignete Primer für *housekeeping*-Gene (HKG) vorhanden waren, noch aus der partiellen Sequenz Primer abgeleitet werden konnten, die die nötige Effizienz und Spezifität besaßen, konnten keine qPCR-Daten für *GgSUT2* gemessen werden. Ebenfalls konnten bereits vorhandene Primer, der in dieser Arbeit untersuchten Gymnospermen, wegen fehlender Effizienz und Spezifität nicht genutzt werden. Daher ist in Abbildung 3.13 ein 1 %iges Agarosegel gezeigt, wo sich die in dieser Arbeit identifizierte partielle Sequenz von *GgSUT2* in allen Organen nachweisen ließ. Allerdings lassen die Intensitäten der Banden keine

Rückschlüsse auf die Ausgangskonzentration der mRNA zu, da die Effizienz der reversen Transkriptase-Reaktion schwanken kann, weshalb eine Normalisierung des Zielgens durch das HKG notwendig ist.

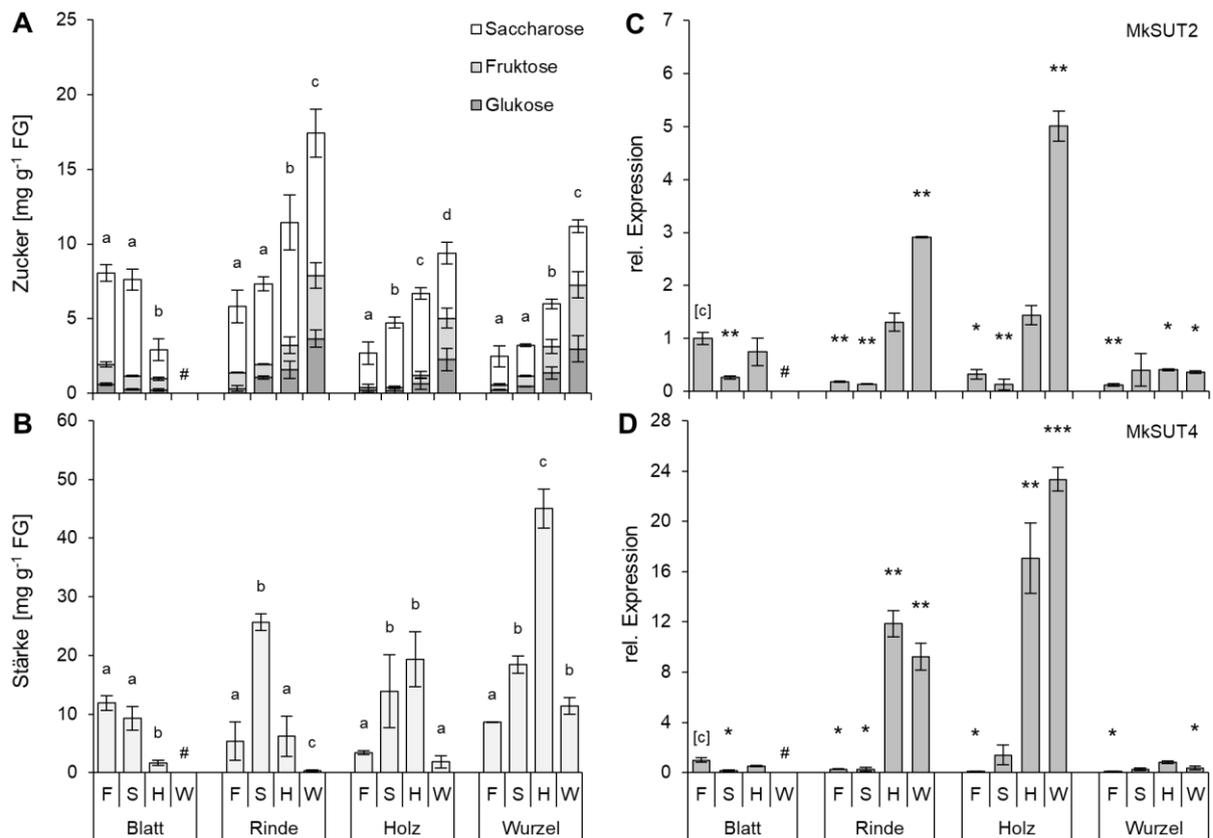


**Abbildung 3.13: Agarosegel zum Nachweis von *GgSUT2* in verschiedenen Pflanzenorganen.** Nachweis von *GgSUT2* (980 Bp; s. Anhang) in Blatt, Rinde, Holz und Wurzel. M: Marker; 1: Blatt; 2: Rinde; 3: Holz; 4: Wurzel; 5: Negativkontrolle ohne *template*; Bp: Basenpaare.

### 3.5.4 *Magnolia kobus*

Wie zuvor in den drei untersuchten Gymnospermen waren auch in der basalen Angiosperme *M. kobus* die dominierenden löslichen Zucker Glukose, Fruktose und Saccharose. Der Gesamtzuckergehalt in den Blättern lag zwischen 3-8 mg g<sup>-1</sup> FG, wobei Saccharose mit 75-85 % dort den größten Anteil einnahm (Abbildung 3.14 A). Der Zuckergehalt nahm im Laufe des Jahres in den Blättern ab, wohingegen er in den anderen Organen von Frühjahr bis Winter anstieg. Ebenso erhöhte sich der Anteil der Hexosen und machte im Winter 50-60 % des Gesamtzuckers aus. Der höchste Zuckergehalt wurde in der Rinde im Winter gemessen (18 mg g<sup>-1</sup> FG).

Der Stärkegehalt in den Blättern sank von 12 mg g<sup>-1</sup> FG im Frühjahr bis zu 2 mg g<sup>-1</sup> FG im Herbst ab (Abbildung 3.14 B). In der Rinde wurde der höchste Stärkegehalt im Sommer gemessen wurde, während er im Holz und in der Wurzel im Herbst am höchsten war.



**Abbildung 3.14: Veränderung des Zucker- und Stärkegehaltes sowie der SUT-Expression verschiedener Organe von *M. kobus* über den Zeitraum eines Jahres.** **A** Organspezifische Verteilung der Zucker. **B** Organspezifische Verteilung von Stärke. Die verschiedenen Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede in Stärke- und Gesamtzuckergehalt innerhalb eines Organs (Tukey's HSD;  $p \leq 0,05$ ). **C** und **D** Expression von *MksUT2* und *MksUT4* relativ zum Kalibrator [c] gemessen. Mit dem T-Test wurde auf signifikante Unterschiede im Vergleich zum Kalibrator getestet (\* =  $p \leq 0,05$ ; \*\* =  $p \leq 0,01$ ; \*\*\* =  $p \leq 0,001$ ). Die Messungen wurden ein zweites Jahr wiederholt und zeigten einen ähnlichen Verlauf (n = 3, Mittelwerte  $\pm$  SD). F: Frühling; S: Sommer; H: Herbst; W: Winter; #: keine Blätter im Winter.

In *M. kobus* wurde neben Zucker und Stärke auch die Expression der Teilsequenzen von *MksUT2* und *MksUT4* gemessen. In den Blättern lag die Expression, abgesehen von einem niedrigeren Level im Sommer, auf Kalibrator-Niveau (Abbildung 3.14 C). Die Expression in der Wurzel war das ganze Jahr über auf einem konstant niedrigen Level, genau wie in der ersten Jahreshälfte in Rinde und Holz. Vom Herbst zum Winter hin kam es zu einem signifikanten Anstieg der Expression in beiden Organen. Das Expressionslevel von *MksUT4* befand sich im Blatt, der Wurzel, sowie in der ersten Jahreshälfte in Rinde und Holz, auf einem konstant niedrigen Niveau (Abbildung 3.14 D). Wie zuvor bei *MksUT2*, kam es auch hier zu einem Anstieg der Expression in der zweiten Jahreshälfte in Rinde und Holz.

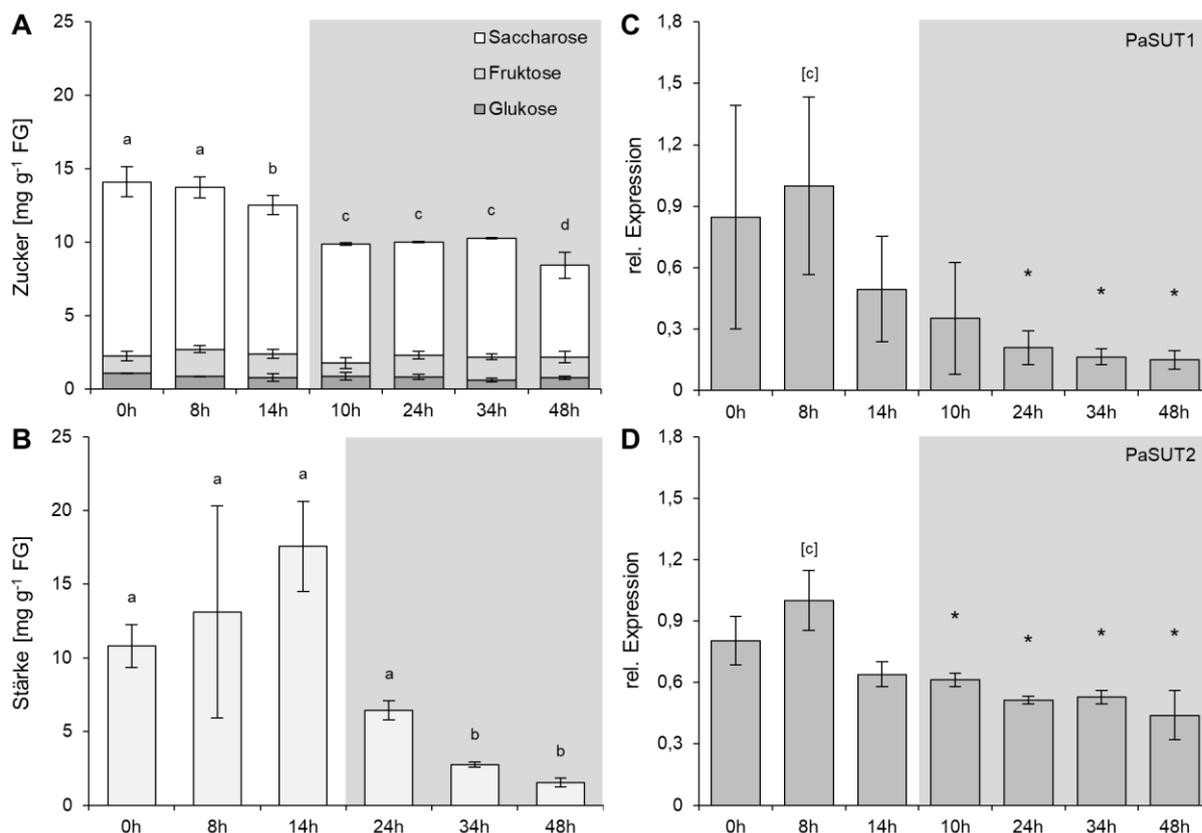
### 3.6 Einfluss von Licht auf den NSC-Gehalt und SUT-Expression

Sowohl die Produktions-, als auch die Exportrate von Kohlenhydraten aus dem Blatt hängt stark von der photosynthetischen Aktivität ab, die vom Licht als Schlüsselfaktor beeinflusst wird (Smith und Stitt, 2007). Deshalb wurde neben dem saisonalen Einfluss auf Zucker-, Stärkegehalt und SUT-Expression, der Einfluss von Licht und Dunkelheit untersucht. Dazu wurden die Pflanzen nach einem normalen Tag-Nacht-Rhythmus einer verlängerten Dunkelphase ausgesetzt. Die Expression der SUT ist relativ zum Kalibrator angegeben. Als Kalibrator wurden die Blattproben in der Mitte der Lichtperiode ausgewählt und auf eins normiert.

#### 3.6.1 *Picea abies*

Der Zuckergehalt in der Lichtperiode lag bei etwa  $13 \text{ mg g}^{-1}$  FG und begann in der Dunkelheit zu sinken (Abbildung 3.15 A). Allerdings lag er nach 48 h Dunkelheit immer noch bei knapp 70 % des Ausgangswertes. Der Anteil von Saccharose am Gesamtzucker ging in der Dunkelheit minimal zurück. Der Stärkegehalt in der Dunkelheit sank ebenfalls, aber im Gegensatz zum Zuckergehalt auf etwa 10 % des Maximalwertes nach 48 h Dauerdunkelheit (Abbildung 3.15 B).

Das Expressionslevel von *PaSUT1* sank bereits gegen Ende der Lichtperiode ab und betrug nach 48 h Dunkelheit etwa ein Viertel des Wertes nach 8 h Licht. Ein ähnlicher Verlauf konnte für *PaSUT2* beobachtet werden, allerdings war der Rückgang der Expression in Dunkelheit weit weniger stark ausgeprägt (Abbildung 3.15 C, D).



**Abbildung 3.15: Einfluss von Licht und Dauerdunkel auf den Zucker- und Stärkegehalt sowie der SUT-Expression in Nadeln von *P. abies*.** **A** und **B** Verteilung von Zucker und Stärke. Die verschiedenen Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede in Stärke- und Gesamtzucker Gehalt (Tukey's HSD;  $p \leq 0,05$ ). **C** und **D** Expression von *PaSUT1* und *PaSUT2* relativ zum Kalibrator [c] gemessen. Mit dem T-Test wurde auf signifikante Unterschiede im Vergleich zum Kalibrator getestet (\* =  $p \leq 0,05$ ; \*\* =  $p \leq 0,01$ ; \*\*\* =  $p \leq 0,001$ ). Zu Sonnenaufgang wurde mit der Probenahme begonnen. Nach 14 h. wurden die Pflanzen 48 h ins Dauerdunkel gestellt (grauer Hintergrund).  $n = 3$ , Mittelwerte  $\pm$  SD. Abb. aus Dobbelstein *et al.*, 2018 (modifiziert).

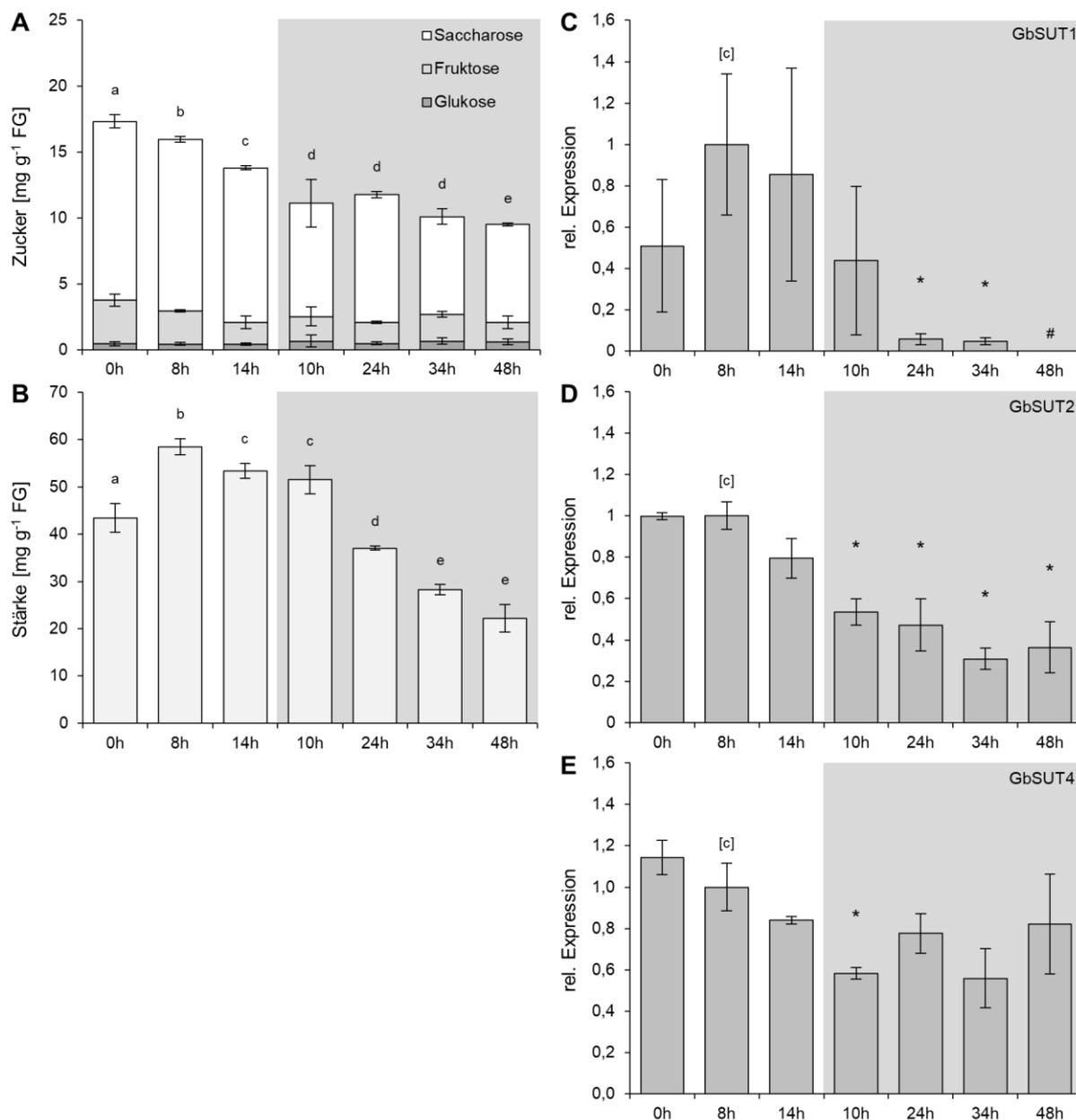
### 3.6.2 *Ginkgo biloba*

In *G. biloba* war der Zuckergehalt in den Blättern zu Beginn der Lichtperiode ebenfalls am höchsten. Ebenso war der Verlauf über den Tag und im Dauerdunkeln analog zu dem in der Fichte (Abbildung 3.16 A, Abbildung 3.15 A).

Wie bereits die Stärkemessung im saisonalen Verlauf gezeigt hat, lag der Stärkegehalt in *G. biloba* deutlich über dem der anderen hier untersuchten Baumarten (Kapitel 3.5).

Der Stärkegehalt sank in Folge der Dauerdunkelheit allerdings nur auf ungefähr 40 % des Maximalwertes am Ende der Lichtperiode ab (Abbildung 3.16 B).

Die Expression von *GbSUT1* erreichte ihr Maximum in der Mitte der Lichtperiode und nahm im weiteren Tagesverlauf ab (Abbildung 3.16 C). Mit anhaltender Dunkelheit verringerte sich das Expressionslevel so stark, dass *GbSUT1* nach 48 h Dauerdunkelheit nicht mehr verlässlich nachgewiesen werden konnte.

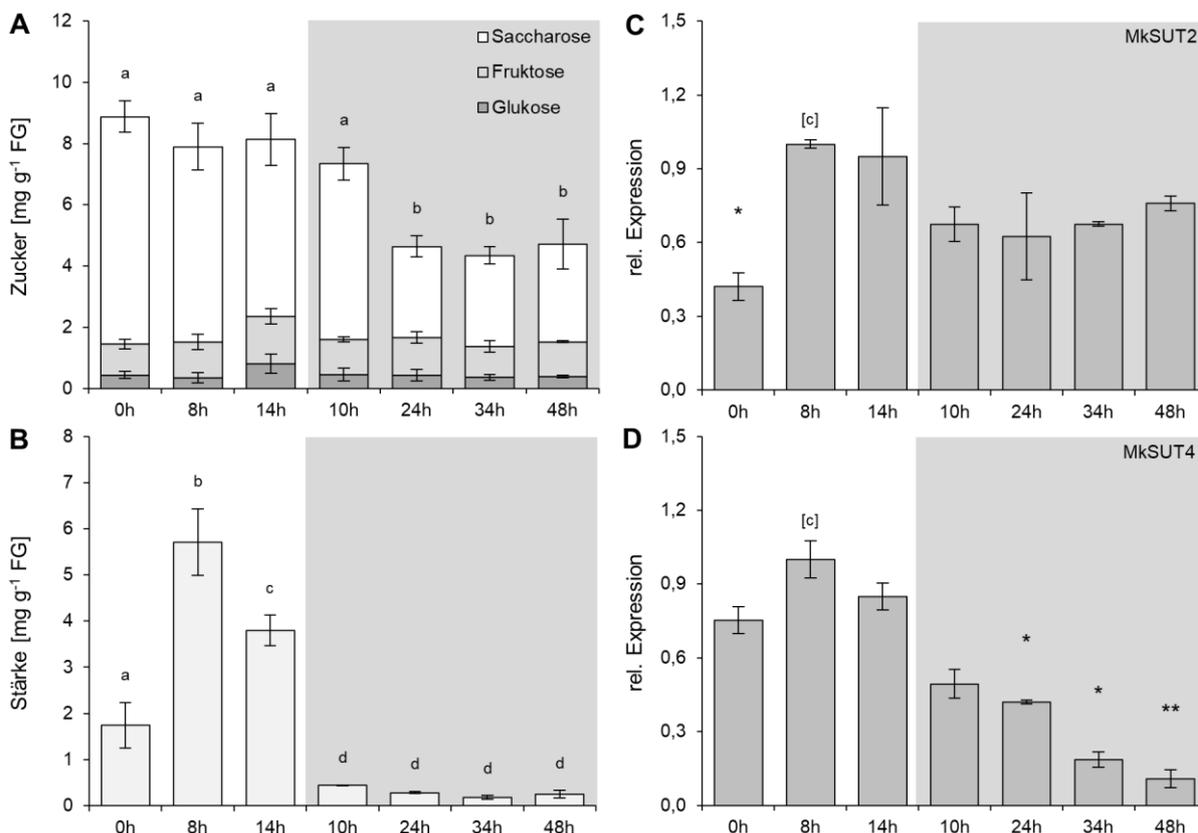


**Abbildung 3.16: Einfluss von Licht und Dauerdunkel auf den Zucker- und Stärkegehalt sowie der SUT-Expression in Blättern von *G. biloba*.** A und B Verteilung von Zucker und Stärke. Die verschiedenen Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede in Stärke- und Gesamtzucker Gehalt (Tukey's HSD;  $p \leq 0,05$ ). C, D und E Expression von *GbSUT1*, *GbSUT2* und *GbSUT4* relativ zum Kalibrator [c] gemessen. Mit dem T-Test wurde auf signifikante Unterschiede im Vergleich zum Kalibrator getestet (\* =  $p \leq 0,05$ ; \*\* =  $p \leq 0,01$ ; \*\*\* =  $p \leq 0,001$ ). Zu Sonnenaufgang wurde mit der Probenahme begonnen. Nach 14 h wurden die Pflanzen 48 h ins Dauerdunkel gestellt (grauer Hintergrund). n = 3, Mittelwerte  $\pm$  SD. #: Transkript nicht detektierbar.

In Bezug auf *GbSUT2* und *GbSUT4* war der jeweilige Verlauf des Expressionslevels vergleichbar. Dieses ging gegen Ende des Tages herunter und pendelte sich in der Dunkelheit auf einem nahezu konstanten Level ein, wenngleich die Expression von *GbSUT4* höher war.

### 3.6.3 *Magnolia kobus*

Die anhaltende Dunkelheit hat auf den Zuckergehalt in *M. kobus* einen vergleichbaren Effekt wie bei den zuvor beschriebenen Gymnospermen. Der Zuckergehalt nahm auch hier ab und war nach 48 h Dunkelheit auf knapp 50 % des Gehaltes der dem Licht ausgesetzten Blätter gefallen (Abbildung 3.17 A).



**Abbildung 3.17: Einfluss von Licht und Dauerdunkel auf den Zucker- und Stärkegehalt sowie der SUT-Expression in Blättern von *M. kobus*.** A und B Verteilung von Zucker und Stärke. Die verschiedenen Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede in Stärke- und Gesamtzuckergehalt (Tukey's HSD;  $p \leq 0,05$ ). C und D Expression von *MksUT2* und *MksUT4* relativ zum Kalibrator [c] gemessen. Mit dem T-Test wurde auf signifikante Unterschiede im Vergleich zum Kalibrator getestet (\* =  $p \leq 0,05$ ; \*\* =  $p \leq 0,01$ ; \*\*\* =  $p \leq 0,001$ ). Zu Sonnenaufgang wurde mit der Probenahme begonnen. Nach 14 h. wurden die Pflanzen 48 h ins Dauerdunkel gestellt (grauer Hintergrund). n = 3, Mittelwerte  $\pm$  SD.

Die Abnahme des Stärkegehaltes in Magnolie war bereits innerhalb der ersten 24 h nach Beginn der Dunkelheit deutlich zu erkennen und nach 48 h war weniger als 10 % des Maximalwertes vorhanden (Abbildung 3.17 B).

Die Expression von *MksUT2* erreichte ihr Maximum in der Mitte der Lichtperiode, nahm in Folge der Dunkelheit wieder ab und stabilisierte sich bei etwa 70 % des Maximalwertes (Abbildung 3.17 C). Der Verlauf der Expression von *MksUT4* ähnelt stark dem von *PaSUT1*. Diese nahm bereits gegen Ende der Lichtperiode ab und betrug nach 48 h Dunkelheit etwa ein Fünftel des Wertes nach 8 h Licht (Abbildung 3.17 D).

### 3.7 Effekt von PCMBS auf den Zuckergehalt in Blatt-Exsudaten

Um weitere Erkenntnisse über den Mechanismus der Phloembeladung bei *G. gnemon* und *M. kobus* zu gewinnen, wurde die Wirkung von PCMBS, einem kompetitiven Inhibitor für Saccharose-Transporter (SUT), auf die Zuckerausscheidung von angeschnittenen Blättern getestet.

Die PCMBS-Behandlung hat die Exsudation der Zucker in beiden Bäumen stark reduziert (um 30 und 51 % gegenüber der Kontrolle; Tabelle 3.6). Im Gegensatz zum Exsudat angeschnittener Blattstiele enthält der Phloensaft in der Regel keine Glukose und keine Fruktose (Abbildung 3.6). Monosaccharid-Transporter von Pflanzen sind, im Gegensatz zu Saccharose-Transportern, unempfindlich gegenüber PCMBS (Schneiderei *et al.*, 2005). Die Hexosen im Phloemexsudat stammen von überwiegend enzymatisch hydrolysierte Saccharose (Heineke *et al.*, 1992) und wird dieser Umstand berücksichtigt, dann lag die Verringerung des Saccharose-Gehaltes bei ungefähr 60-75 %.

**Tabelle 3.6: Effekt von PCMBS auf die Exsudation der Zucker von *G. gnemon* und *M. kobus***

	Kontrolle [mmol g <sup>-1</sup> FG h <sup>-1</sup> ]	PCMBS	% der Kontrolle
<i>G. gnemon</i>			
Glukose und Fruktose	50,1 ± 23,6	12,6 ± 2,6	25
Saccharose	11,2 ± 5,6	5,7 ± 1,2	51
<i>M. kobus</i>			
Glukose und Fruktose	13,8 ± 3,8	5,8 ± 2,2	42
Saccharose	2,9 ± 0,9	0,9 ± 0,3	30

n = 6, Mittelwerte ± SD. Tab. aus Fink *et al.*, 2018 (modifiziert).

## 4 Diskussion

### 4.1 Anwendbarkeit der Kriterien zur Bestimmung des Phloembeladungs-Mechanismus bei Bäumen

Für die Bestimmung des Phloembeladungs-Mechanismus werden verschiedene Methoden angewendet: *Minor vein*-Anatomie, Plasmolyse-Experimente und Autoradiographie-Studien. Diese Kriterien bzw. Methoden werden im Folgenden für ihre Verwendbarkeit bei Bäumen diskutiert.

Die Einteilung des Phloems in einen offenen bzw. geschlossenen Typ aufgrund der Anzahl von Plasmodesmata (PL) zwischen den verschiedenen Zelltypen des Phloems (Gamalei, 1989; 1991) war die Grundlage zur Annahme der passiven Phloembeladung bei Bäumen. Allerdings ist es oft schwierig, die genaue Anzahl an PL zu bestimmen wie die Diskrepanz im Tulpenbaum (*Liriodendron tulipifera*) zeigt. So bestimmten Goggin *et al.* (2001)  $3,65 \text{ PL } \mu\text{m}^{-2}$  zwischen Phloem-Parenchymzellen und Geleitzellen, während Gamalei (1991) einen mehr als sechsmal höheren Wert ( $23,62 \text{ PL } \mu\text{m}^{-2}$ ) für die gleiche Baumart publizierte. Unterschiede zwischen dem offenen und dem geschlossenen Typ sind lediglich Frequenzunterschiede und mehr oder weniger willkürlich (Goggin *et al.*, 2001).

Die passive Beladung des Phloems wurde das erste Mal nach Plasmolyse-Versuchen an der Trauerweide (*Salix babylonica*) durch Turgeon und Medville (1998) postuliert. Bereits Mitte der 80er Jahre konnte durch Plasmolyse-Versuche an *Populus deltoides* (Schwarz-Pappel) demonstriert werden, dass die Zellen des Phloems bei ähnlichen Konzentrationen plasmolysierten wie die des umliegenden Mesophylls (Russin und Evert, 1985). Ein Kritikpunkt an Plasmolyse-Versuchen ist jedoch die fehlende Unterscheidung des Stoffes, welcher im Gewebe für dessen osmotisches Potential verantwortlich ist. Da es in Bäumen viele osmotisch wirksame Substanzen gibt (Fu *et al.*, 2011) kann es für Saccharose oder andere Zucker trotzdem einen ansteigenden Gradienten in Richtung Phloem geben.

Weitere Untersuchungen zum Phloembeladungs-Mechanismus wurden mit der Autoradiographie (Fondy und Geiger, 1977) durchgeführt. Dabei wird untersucht ob die Blattadern nach der Aufnahme von  $^{14}\text{CO}_2$  oder  $^{14}\text{C}$  markierten Zuckern intensiver radioaktiv markiert sind als die umliegenden Zellen, was für einen aktiven Mechanismus sprechen würde (van Bel, 1994). Diese Methode stellt bei krautigen Pflanzen ein gut etabliertes Analyseverfahren dar (van Bel, 1994), allerdings haben holzige Pflanzen in der Regel viel dickere Blätter, was zu Problemen mit den Autoradiogrammen führen kann. Bei *Liriodendron tulipifera* konnte erst nach Entfernung der Epidermis eine Akkumulation von Saccharose in den Blattadern festgestellt werden (Goggin *et al.*, 2001). Bei *G. biloba* kamen Autoradiographie-Studien zu teils gegensätzlichen Ergebnissen. Eschrich und Fromm (1994) zeigten, dass nach der Inkubation ausgestanzter Blattstücke mit radioaktiv-markierter Saccharose, die Blattadern

im Vergleich zum umliegenden Gewebe nicht markiert waren. Radioaktivität konnte stattdessen in den Epidermiszellen nachgewiesen werden. In Experimenten mit  $^{14}\text{CO}_2$ , durchgeführt von van Bel (1994), waren hingegen die Blattadern stark markiert. Des Weiteren sind Venenbilder in Autoradiographien bei Pflanzen schwer zu erkennen, die einen mittleren bis hohen Blutzuckeranteil besitzen (Rennie und Turgeon, 2009), wie dies in den Blättern von Bäumen der Fall ist (Fu *et al.*, 2011; Fink *et al.*, 2018). Für einige Mitglieder der Fagaceae, z.B. *Fagus sylvatica* (*F.sylvatica*) oder *Quercus rubra*, wurde wegen des Fehlens von Venenbildern in Autoradiographie-Studien von Blattscheiben ebenfalls eine passive Phloembeladung angenommen (Rennie und Turgeon, 2009). Ob deshalb eine rein passive symplastische Beladung durch Diffusion für alle Laubbäume angenommen werden kann, darf aufgrund der eingesetzten Methoden kritisch betrachtet werden.

Daher sollte die Art der Phloembeladung mit anderen Verfahren nachgewiesen werden, um die Nachteile der genannten Methoden zu vermeiden. Die Methode der nicht-wässrigen Fraktionierung (NWF) und die Laser-Aphid-Technik erlauben eine Aussage über die Verteilung der Photoassimilate in den subzellulären Kompartimenten von Mesophyllzellen der *source*-Blätter und des Phloemsafte und somit über das Diffusionspotenzial vom Mesophyll zum Phloem. Neuere Studien zeigen, dass die Saccharose-Konzentration im Phloemsaft von *F. sylvatica*, *Fraxinus excelsior* (*F. excelsior*) und *Quercus robur* (*Q. robur*) um ein Vielfaches höher war als im Cytosol der Mesophyllzellen (Öner-Sieben und Lohaus 2014; Fink *et al.*, 2018). Dies konnte ebenso für *M. kobus* gezeigt werden (Abbildung 3.6). Die Ergebnisse für *F. sylvatica*, *Q. robur* und *M. kobus* zeigen, dass von einer aktiven Phloembeladung ausgegangen werden muss. Ferner nahm die Exsudation von Saccharose aus angeschnittenen Blättern in Gegenwart des Sulfhydrylgruppen-Blockers p-Chlormercuribenzenzolsulfonsäure (PCMBS) in *F. sylvatica* (Fink *et al.*, 2018) und *M. kobus* ab (Tabelle 3.6). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass es ein erhebliches Maß an Saccharose-Aufnahme in das Phloem durch die Aktivität eines SUT gibt und QrSUT1 und FsSUT1 (beide Typ I) an diesem Prozess beteiligt sein können (Öner-Sieben *et al.*, 2015; Dobbstein *et al.*, 2018). Dies zeigt die Bedeutsamkeit des Einsatzes moderner molekularbiologischer und biochemischer Methoden zur Identifikation, Lokalisation und Charakterisierung von Saccharose-Transportern.

## 4.2 Saccharose-Transporter in Gymnospermen

Nachdem bereits in den 70er Jahren eine aktive Phloembeladung durch Transporter postuliert wurde (Sovonick *et al.*, 1974; Giaquinta, 1976; Komor *et al.*, 1977), wurden erst knapp 20 Jahre später die ersten SUT aus Spinat (SoSUT1) und Kartoffel (StSUT1) identifiziert, isoliert und charakterisiert (Riesmeier *et al.*, 1992; 1993). Seitdem wurden eine Vielzahl von SUT beschrieben, darunter auch zahlreiche in Angiospermen-Baumarten (Decourteix *et al.*, 2006; Payyavula *et al.*, 2011; Tang *et al.*, 2010; Öner-Sieben und Lohaus 2014; Öner-Sieben *et al.*, 2015; Dobbstein *et al.*, 2018). In den Gymnospermen hingegen wurden bisher keine SUT gefunden.

In der vorliegenden Arbeit konnten erstmals putative SUT-Sequenzen in Gymnospermen durch einen PCR-Ansatz mit degenerierten Primern und RACE identifiziert werden (Tabelle 3.4). Hydropathie-Analysen und Strukturberechnungen der SUT aus Fichte und Ginkgo haben ergeben, dass sie 12  $\alpha$ -helikale membranständige Domänen besitzen. Dies trifft auf bisher alle bekannten SUT zu (Lalonde *et al.*, 1999; Lemoine, 2000; Williams *et al.*, 2000). Des Weiteren teilen alle identifizierten SUT eine hohe Sequenzähnlichkeit mit anderen bereits bekannten SUT aus verschiedenen Baumarten (Tabelle 3.5) und bilden jeweils eigenständige *cluster* innerhalb der drei verschiedenen SUT-Typen (Abbildung 3.7). Mit *PaSUT1* aus *P. abies* und *GbSUT1* aus *G. biloba* wurden zwei SUT des Typ I gefunden.

Darüber hinaus war es möglich, sowohl komplette Sequenzen aus der Typ II-Gruppe in beiden Gymnospermen zu identifizieren (*PaSUT2*, *GbSUT2*, Abbildung 3.7), als auch eine partielle SUT-Sequenz in *G. gnemon* (*GgSUT2*). In dieser Gruppe gibt es auch SUT-Sequenzen aus dem Laubmoos (Bryophyta) *Physcomitrella patens* (*P. patens*), einer nicht-vaskulären Landpflanze, und dem Moosfarn (Lycophyta) *Selaginella moellendorffii* (*S. moellendorffii*), einer vaskulären nicht-samenbildenden Landpflanze (Abbildung 3.7). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass jedes Genom der Landpflanzen mindestens ein Gen aus der Gruppe dieses Typs besitzt (Reinders *et al.*, 2012). *PpSUT2A* und *B* aus *P. patens*, *SmSUT2* aus *S. moellendorffii*, *PaSUT2* und *GbSUT2* besitzen im Vergleich zum SUT-Typ II aus Angiospermen einen längeren zentralen *loop* mit konservierten Regionen, die für Angiospermen-Transporter dieses Typs charakteristisch sind. Dies deutet darauf hin, dass der Typ II-SUT mit längerem zentralen *loop* die ursprüngliche Form der SUT dieses Typs in Angiospermen darstellt.

Die Gruppe III enthält Transporter, die im Tonoplasten oder in der Plasmamembran lokalisiert sind (Schneider *et al.*, 2012; Chincinska *et al.*, 2013). Ein SUT vom Typ III wurde in Gymnospermen bisher nur in *G. biloba* gefunden (*GbSUT4*, Abbildung 3.7).

Alle sechs identifizierten SUT konnten auf mRNA-Ebene in verschiedenen Pflanzenorganen über das komplette Jahr nachgewiesen werden (Abbildung 3.9 C,D; 3.10 C-E). Für *GgSUT2* konnte der Nachweis bisher nur zu einem Zeitpunkt erfolgen (Abbildung 3.13), allerdings kann aufgrund der Ergebnisse der anderen untersuchten Baumarten und zusätzlichen Hinweisen aus

der Literatur (Öner-Sieben *et al.*, 2015; Dobbstein *et al.*, 2018) von einer ganzjährigen Expression ausgegangen werden.

Der voranschreitende Abschluss von zusätzlichen Genom- und EST-Projekten in anderen Gymnospermen-Baumarten (Nystedt *et al.*, 2013) wird wahrscheinlich noch weitere SUT-Gene offenbaren.

#### 4.2.1 Funktions-Charakterisierung – ein *targeting*-Problem

Die biochemische Charakterisierung der SUT aus *P. abies* (PaSUT1 und PaSUT2), sowie der SUT aus *G. biloba* (GbSUT1, GbSUT2 und GbSUT4) mittels Hefe-Komplementation in Zusammenarbeit mit Dr. F. Klebl (AG Molekulare Pflanzenphysiologie, Universität Erlangen-Nürnberg) war nach mehrmaligen Versuchen nicht erfolgreich. Dafür kann es mehrere Gründe geben: Zum einen könnten die SUT nicht funktional sein und zum anderen könnte mit Saccharose das falsche Substrat ausgewählt worden sein. Allerdings sprechen die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse dagegen. Deutlich wahrscheinlicher ist, dass ein fehlerhaftes Membran-*targeting* der SUT-Proteine in den Hefezellen für die fehlende Saccharose-Aufnahmeaktivität verantwortlich ist. Hefezellen können in einigen Fällen nicht als heterologe Expressionssysteme für die Messung von Transporteraktivitäten geeignet sein. Der evolutionäre Abstand zwischen Pflanzen und Hefen kann dazu führen, dass das Pflanzenprotein nicht an die richtige Membran in der Hefe gelangt ist (Barker *et al.*, 2000; Schneider *et al.*, 2012) oder wesentliche Proteinmodifikationen fehlen und daher seine normale Aktivität im heterologen System nicht zeigt. Tatsächlich zeigte die Expression von GFP-Konstrukten mit den beiden SUT aus *P. abies* in Hefe, dass die Fusionsproteine nicht in der Hefeplastamembran lokalisiert werden konnten (F. Klebl, pers. Mitteilung). Dieses Problem existierte auch für AtSUC7 aus *A. thaliana*, weshalb angenommen wurde, dass es sich um ein Pseudogen für ein funktionsloses Protein handelt (Sauer *et al.*, 2004). Rottmann *et al.* (2018) konnten die Messung von AtSUC7 mit einem neu entwickeltem Protoplasten-Esculin-Assay in *A. thaliana* durchführen, da die Protoplasten der Mesophyllzellen das einzige Expressionssystem waren, bei dem der Transporter in die Plasmamembran gelangte. Deshalb soll diese Methode in zukünftigen Studien auch mit den SUT aus *P. abies* und *G. biloba* durchgeführt werden.

#### 4.2.2 Kein Typ III-SUT in Koniferen?

In *P. abies* konnte weder in der Genomdatenbank (congenie.org, Nystedt *et al.*, 2013), noch durch ein großangelegtes *screening* von cDNA ganzjähriger *sink*- und *source*-Gewebeproben ein SUT vom Typ III gefunden werden. Ebenso lieferten Analysen der restlichen bisher veröffentlichten Koniferen-Genomen von *Pinus taeda* (Zimin *et al.*, 2014), *Picea glauca* (Warren *et al.*, 2015) *Pinus lambertiana* (Crepeau *et al.*, 2017), *Pseudotsuga menziesii* (Neale *et al.*, 2017) und der erst kürzlich veröffentlichten Sequenz von *Abies alba* (Mosca *et al.*, 2019) keinen Hinweis auf einen SUT-Typ III. In *G. biloba* und der basalen Angiospermen *M. Kobus* wurden hingegen mit *GbSUT4* bzw. *MkSUT4* Typ III Transporter-Sequenzen nachgewiesen. Im Gegensatz zu *P. abies* besitzen *P. patens* und *S. moellendorffii* keinen SUT des Typ I, aber mehrere Homologe des Typ III (Abbildung 3.7). Typ I-SUT werden in Eudikotyledonen in der Plasmamembran lokalisiert und basierend auf Phylogenie und Substratspezifität (Reinders *et al.*, 2012) sind sie den Typ III-SUT ähnlicher als den Typ II-SUT (Tabelle 3.5). Da Typ III-SUT sowohl in den Bryophyta, als auch in den Lycophyta vorhanden sind, kommen mehrere phylogenetische Studien zu dem Schluss, dass die Typ I-SUT aus denen des Typ III hervorgegangen sind (Reinders *et al.*, 2012; Peng *et al.*, 2014). Eine Differenzierung von Typ I- und Typ III-SUT könnte mit der Evolution des Phloems einhergehen, um den Ferntransport von Photoassimilaten zu unterstützen (van Bel, 1999). In Anbetracht fehlender bioinformatischer und experimenteller Nachweise und der Schlussfolgerung aus phylogenetischen Analysen, darf angenommen werden, dass es in Koniferen keinen SUT-Typ III mehr gibt.

#### 4.2.3 PaSUT1 – Lokalisation im Tonoplasten

In Vorbereitung des Protoplasten-Esculin-Assays in *A. thaliana* mit den SUT aus *P. abies* und *G. biloba* zeigte sich, dass PaSUT1, nach der Transformation in Protoplasten, im Tonoplast lokalisiert zu sein scheint (F. Klebl, pers. Mitteilung). Es handelt sich dabei um ein vorläufiges Ergebnis, welches noch verifiziert werden muss. Vor diesem Hintergrund ist eine Doppellokalisierung von PaSUT1 in der Plasmamembran und dem Tonoplasten denkbar, wie sie bereits für den Typ III-SUT aus Kartoffel (*StSUT4*) gezeigt werden konnte (Chincinska *et al.*, 2013). In dieser Studie wird aber auch darauf hingewiesen, dass Untersuchungen mittels GFP-Fusion, im Gegensatz zu Funktionscharakterisierungen, fast immer eine Lokalisation im Tonoplasten ergaben. Eine Lokalisation von PaSUT1 im Tonoplasten steht zudem im direkten Kontrast zu den Ergebnissen der Sequenz- und Phylogenie-Analyse, welche ihn dem Typ I zuordnet (Abbildung 3.7). Es wurde mit *GbSUT4* bisher erst ein SUT-Typ III in Gymnospermen identifiziert (Tabelle 3.4), allerdings zeigt PaSUT1 zu diesem SUT eine vergleichbare Ähnlichkeit (78 %) wie zu den Typ III-SUT aus *Q. robur* (Eiche) und *Populus tremula x alba* (Pappel) (74 %; Tabelle 3.5). Entsprechende Ähnlichkeiten zu den SUT4 aus Eiche, Pappel und Ginkgo, zeigen auch die Typ I SUT von *F. sylvatica*, *F. excelsior* und *Juglans regia* (Tabelle 3.5).

Ferner scheint es beim PaSUT1-GFP-Konstrukt Unterschiede zwischen N- und C-terminal fusioniertem GFP zu geben, welche auf ein mögliches intramolekulares Lokalisationssignal hindeuten (F. Klebl, pers. Mitteilung). Für den Monosaccharid-Transporter ESL1 aus *A. thaliana* wurde gezeigt, dass ein Di-Leucin-Motiv (LXXLL) in der N-terminalen cytoplasmatischen Domäne für die Translokation des Transporters in den Tonoplasten verantwortlich ist (Yamada *et al.*, 2010). Des Weiteren wurde demonstriert, dass Di-Leucin-Motive in der N- oder C-terminalen Domäne von Peptid-, Glukose- und Inosit-Transportern für das *targeting* in den Tonoplasten nötig sind (Komarova *et al.*, 2012). Reinders *et al.* (2012) fanden durch eine Sequenzanalyse von Typ III-SUT in krautigen Angiospermen ein LXXLL Di-Leucin-Motiv in der N-terminalen Domäne, welches bei den anderen SUT-Typen nicht vorhanden war. Daraufhin wurde angenommen, dass es sich dabei um das vakuoläre *targeting*-Signal handelt. Ein Sequenzvergleich von Typ III-SUT aus Angiospermen-Baumarten, den Gymnospermen-Sequenzen PaSUT1 und GbSUT4, sowie *Physcomitrella* und *Selaginella*, zeigt, dass alle Angiospermen Typ III-SUT ein vollständiges LXXLL-Motiv in der N-terminalen Region besitzen, während es bei *G. biloba*, *P. patens* und *S. moellendorffii* unvollständig ist (Tabelle 4.1).

**Tabelle 4.1: Putative N-terminale Di-Leucin-Sequenz als vakuoläres-targeting-Signal in Typ III-SUT**

Typ	Name	Sequenz
I	FeSUT1	22EPLRKLIPVAAIAAGVCF38
	GbSUT1	15VPLRTVARVASVATGVCF31
	PaSUT1	15VPL <b>RLTL</b> ARVASVAAGVCF31
II	GbSUT2	52SLKTLILSCMIAAGVQFG69
	PaSUT2	54SLKTLILSCMIAAGVQFG71
	QrSUT2	67CSLATLVLSCTIAAGVQF84
III	GbSUT4	35VPL <b>RS</b> LFRVASVACGVQF52
	HbSUT4	21VPL <b>RQLLR</b> RVTSVAGGIQF38
	MdSUT1	21VPL <b>RQLLR</b> RVASVACGIQF38
	SmSUT4A	15VPL <b>RS</b> LARVACVAAGVQF32
	SmSUT4B	15VPL <b>KAL</b> ARVASVAAGVQF32
	SmSUT4C	22VPL <b>RGL</b> ARVASVALGVQF39
	SmSUT4D	26IR <b>QRQL</b> FRVSSVAAGIQF43
	PpSUT4A	12VPIR <b>ALI</b> QVASVAAGVQF29
	PpSUT4C	12VPIR <b>ALI</b> QVASVAAGVQF29
	PtaSUT4	32VPL <b>RQLLR</b> RVTSIAGGIQF49
	QrSUT4	36IPL <b>RRLLR</b> RVASVACGIQF49
	RcSUC4	32VSL <b>RKLLR</b> RVTSIAGGIQF49

Dargestellt ist ein Ausschnitt eines Protein-Sequenz-Alignments. Die Zahlen geben die Position der Aminosäuren (AS) in jedem Protein an. Die AS, die dem LXXLL-Motiv entsprechen sind fettgedruckt. Die Zugriffsnummern der verwendeten SUT befinden sich in der Liste der SUT für phylogenetische Analyse im Anhang. Fe: *Fraxinus excelsior*; Gb: *Ginkgo biloba*; Hb: *Hevea brasiliensis*; Jr: *Juglans regia*; Md: *Malus domestica*; Pa: *Picea abies*; Pp: *Physcomitrella patens*; Pta: *Populus tremula x alba*; Qr: *Quercus robur*; Rc: *Ricinus communis*; Sm: *Selaginella moellendorffii*.

Auch beim SUT1 aus *P. abies* war das Motiv nicht vollständig, da das zweite Leucin gegen ein Alanin ausgetauscht wurde. Basierend auf der in Kapitel 4.2.2 beschriebenen Annahme, dass die Typ I-SUT aus denen des Typs III hervorgegangen sind, könnte das vakuoläre *targeting*-Signal durch Mutation verändert worden sein.

### 4.3 Mögliche Beteiligung von PaSUT1 und PaSUT2 am *pre-phloem-pathway*

Der *pre-phloem-pathway* von Assimilaten in Koniferen ist strukturell gekennzeichnet durch eine hohe Anzahl von Plasmodesmata (PL) zwischen allen Zelltypen, beginnend im Mesophyll (MZ) über die Bündelscheide (BS), das Transfusionsparenchym (TP), die Strasburger-Zellen (StZ) bis hin zu den Siebzellen (SZ) (Abbildung 3.1 und Blechschmidt Schneider *et al.*, 1997; Liesche und Schulz, 2012; 2013). Im Gegensatz zu den Angiospermen hat die BS bei den Koniferen die Eigenschaften einer Endodermis und ist mit Casparischen Streifen ausgestattet. Diese blockieren den Durchgang von gelösten Mineralien und Photoassimilaten durch die Zellwände und Interzellular-Räume und der Transport im apoplastischen Raum wird damit gestoppt. Auf diese Weise müssen Wasser und Mineralien durch die durchlässigen Zellen der BS. Dies macht die BS zu einem wichtigen Kontrollpunkt des Nährstofftransports, aber auch einen Engpass für den gegenläufigen Fluss von Mineralien und Photoassimilaten, da sich dort der *pre-phloem*- und *post-xylem-pathway* begegnen (Abbildung 1.2). Münch (1930) bezweifelte, dass der gegenläufige Fluss von Wasser und Photoassimilaten in den gleichen Zellen untergebracht werden könnte, da ein solches Aufeinandertreffen zu einem sehr ineffizienten Transport von Wasser und Assimilaten führen würde.

Die TP-Zellen teilen sich eine große Oberfläche mit den Transfusionstracheiden (TT), welche mit Wasser und Mineralien gefüllt sind. Ein starker Gradient im Wasserpotential über die Plasmamembran der TP-Zellen würde zu einem erheblichen Verlust von Saccharose führen (Liesche *et al.*, 2011a). Die Aufgabe von PaSUT1, dessen mRNA mit der *in-situ*-Hybridisierung ausschließlich im TP lokalisiert wurde (Abbildung 3.8 A, B), könnte die Rückgewinnung dieser Saccharose sein. Canny (1993) zeigte in Nadeln durch Versuche mit fluoreszierenden apoplastischen *tracern*, welche über den Transpirationsstrom aufgenommen wurden, dass diese an der Plasmamembran des TP landeten und diese sogar überquerten. Ferner zeigte er durch Autoradiographiestudien mit radioaktiv markiertem Aspartat, dass dieses vom TP gesammelt und über die StZ in das Phloem zurück gelangte. Zum Teil wurde das markierte Aspartat auch in den MZ nachgewiesen. Dies führte Canny (1993) zu dem Schluss, dass Transporter im TP aktiv gelöste Stoffe aus dem Transpirationsstrom zurückgewinnen.

Eine weitere Möglichkeit die beiden gegenläufigen Ströme effektiv in der Nadel ablaufen zu lassen wäre eine Trennung durch Kompartimentierung in der BS und dem TP. Dies könnte

durch eine Beteiligung des endoplasmatischen Retikulums (ER) und der Vakuole erreicht werden. In höheren Pflanzen ist das ER integraler Bestandteil von PL und bildet über Desmotubuli Verbindungen zum ER benachbarter Zellen (Roberts, 2005). Liesche *et al.* (2011a) spekulierten, dass die aus dem Mesophyll kommende Saccharose an der BS, oder an irgendeiner anderen Stelle zwischen BS und StZ, durch das ER aufgenommen werden könnte. Ausgehend von den Lokalisationsergebnissen für *PaSUT1* (Abbildung 3.8 A, B) und *PaSUT2*, welcher im Phloem lokalisiert wurde (Abbildung 3.8 C, D), könnte PaSUT1 die Saccharose in das ER aufnehmen und PaSUT2 für die Abgabe der Saccharose in die SZ zuständig sein. Über eine mögliche Rolle des interzellulären ER bei der Phloembeladung von Nadelbäumen unter der Berücksichtigung möglicher SUT, wurde bereits von Carde (1974), Glockmann und Kollmann (1996) und Schulz (2005) diskutiert.

Vor dem Hintergrund einer möglichen Lokalisation von PaSUT1 im Tonoplasten, kann auch die Vakuole in diesen Prozess involviert sein. Lazzaro und Thomson (1966) zeigten für Trichome der Kichererbse (*Cicer arietinum*), dass es eine kontinuierliche Verbindung von Vakuolen über das ER durch PL gibt.

## 4.4 SUT – Expression, Funktionen und Regulation

### 4.4.1 Gewebespezifische SUT-Expression und mögliche Funktionen

In dieser Arbeit wurden verschiedene SUT-Typen in den beiden Gymnospermen *P. abies* (PaSUT1, PaSUT2) und *G. biloba* (GbSUT1, GbSUT2, GbSUT4), sowie in der basalen Angiospermen *M. kobus* (MkSUT2, MkSUT4) gefunden. Die SUT-mRNA wurden in verschiedenen Pflanzenorganen über die gesamte Vegetationsperiode nachgewiesen (Abbildung 3.9 C, D; Abbildung 3.10 C-E; Abbildung 3.14 C, D). In *G. gnemon* wurde eine partielle Sequenz eines SUT-Typ II isoliert (*GgSUT2*), welche ebenfalls in allen Organen exprimiert wurde (Abbildung 3.13).

Die Analyse der gewebespezifischen Expression von *PaSUT1* zeigte, dass die Expression im Holz in der ersten Jahreshälfte am stärksten war, gefolgt von der Expression in der Rinde und den Nadeln (Abbildung 3.9 C). In *Populus tremula x alba* war die Expression des Typ I-SUT *PtaSUT3* ebenfalls im Holz am stärksten, insbesondere in Xylem-Gefäßen und Faserzellen (Payyavula *et al.*, 2011). In einer anderen Pappelart zeigten Mahboubi *et al.* (2013), dass PttSUT3, ebenfalls ein Typ I-SUT, an der Aufnahme von Saccharose in zellwandbildende sekundäre Holzfasern beteiligt ist. Bei krautigen Pflanzen, sowie *Q. robur* und *F. sylvatica* wurden die SUT des Typ I in den Blättern mit der Phloembeladung in Verbindung gebracht (Riesmeier *et al.*, 1993; Sauer *et al.*, 1994; Sauer, 2007; Reinders *et al.*, 2012; Öner-Sieben *et al.*, 2015; Dobbstein *et al.*, 2018). Ausgehend von der Lokalisation von *PaSUT1* wurde bereits über eine Beteiligung am Saccharose-Transport im *pre-phloem-pathway* diskutiert.

Des Weiteren wurde über die Rückgewinnung von Saccharose aus angrenzenden Geweben durch SUT als ein wichtiger Mechanismus zur Kompensation des Saccharose-Verlustes der Siebelemente entlang des gesamten Transportphloems diskutiert (Minchin und Thorpe, 1987). Allerdings könnte die Entladerate für Saccharose in den Stämmen von Koniferen niedriger sein als bei Laubbaumarten (Woodruff und Meinzer, 2011). In *P. abies* nahm die *PaSUT1*-Expression im Stamm vom Winter zum Frühjahr sukzessive zu und war im Sommer am höchsten, was darauf hindeuten kann, dass der Rückgewinnungs-Mechanismus für Saccharose aufgebaut wurde.

Im Gegensatz zum Nadelbaum *P. abies* ist die *SUT1*-Expression in der Laubblatt-tragenden Gymnospermen *G. biloba* in Holz, Wurzel und Rinde in der zweiten Jahreshälfte am stärksten und in den *source*-Blättern mit Abstand am geringsten (Abbildung 3.10 C). In *J. regia* zeigte der Typ I-SUT *JrSUT1* eine sehr spezifische Expression im Winter im Xylem und in der Rinde, während in *source*-Blättern kaum Transkript gefunden wurde (Decourteix *et al.*, 2006). Die Daten zeigten, dass *JrSUT1* nach einem Frost-Tau-Zyklus an der Saccharose-Gewinnung aus Xylem-Gefäßen beteiligt war. In *Citrus sinensis* (Orangenbaum) und *Betula pendula* (Hänge-Birke) konnten die korrespondierenden Typ I-SUT nur in *sink*-Organen nachgewiesen werden und dort insbesondere in den Wurzeln (Li *et al.*, 2003; Wright *et al.*, 2000). Es liegen noch keine Lokalisationsergebnisse vor, aber die im Verhältnis zu den anderen Organen deutlich geringe Expression von *GbSUT1* in den *source*-Blättern lässt nicht unbedingt auf eine Beteiligung an der Phloembeladung schließen. Xu *et al.* (2018) zeigten in ihrer Studie mittels qPCR in Blättern, dass unter kontrollierten Bedingungen die Expression des für die Phloembeladung verantwortlichen SUT im Allgemeinen die höchste Rate aufweist. Allerdings ist in der Studie die Pappel als einziger Baum vertreten, für den bereits eine passiv-symplastische Phloembeladung nachgewiesen wurde (Payyavula *et al.*, 2011). Bei einer Lokalisation im Phloem ließe sich die geringe Expression eventuell mit dem sehr geringen Anteil des Phloems ( $\leq 1\%$ ) am Gesamtvolumen eines Blattes erklären (Haritatos *et al.*, 1996). Die *GbSUT1*-Expression ist in den sich entfaltenden *sink*-Blättern hingegen mehr als anderthalbmal so hoch (Abbildung 3.11), was eine Rolle bei der Entwicklung und dem Aufbau des Blattes wahrscheinlich macht. Das Typ I-SUT an Entwicklungsprozessen beteiligt sein können wurde für *AtSUC1* aus *A. thaliana* und *StSUT1* aus der Kartoffel gezeigt. *AtSUC1* ist an der Pollenkeimung und der Pollenschlauchführung beteiligt (Stadler *et al.*, 1999; Sivitz *et al.*, 2008) und *StSUT1* spielt, neben der Phloembeladung in den *minor veins*, eine Rolle bei der Knollenentwicklung (Kühn *et al.*, 2003).

*PaSUT2* wurde in allen Geweben über den Zeitraum eines Jahres, abgesehen von leichtem Expressionsanstieg im Sommer in Nadeln, Rinde und Holz, auf nahezu konstantem Niveau exprimiert (Abbildung 3.9 D). Ein ähnliches Expressionsmuster zeigte der *SUT2* aus *Q. robur* (Dobbelstein *et al.*, 2018). Vermutlich hat der *SUT2* das ganze Jahr über eine basale Funktion im Stoffwechsel. Eine Rückgewinnung von Saccharose entlang des Phloempfadens (Srivastava

*et al.*, 2008), sowie eine Rolle bei der Phloementladung werden auch für Typ II-SUT diskutiert (Barth *et al.*, 2003; Sauer, 2007), da sie in den Siebelementen des Phloems und in anderen Zelltypen von *sink*-Geweben lokalisiert wurden (Barth *et al.*, 2003; Sauer 2007). Die Expression von *GbSUT2* lag, mit Ausnahme in den *source*-Blättern im Frühjahr, ebenfalls in allen Organen das ganze Jahr über auf einem konstant niedrigen Niveau (Abbildung 3.10 D). Neben der Beteiligung am Rückgewinnungs-Mechanismus für Saccharose wurde lange vermutet, dass Typ II-SUT als Saccharose-Sensoren eine Rolle spielen, da sie im Vergleich zu den anderen SUT-Typen über einen viel längeren zentralen *loop* verfügen. Allerdings konnte diese Vermutung bisher nicht verifiziert werden (Barker *et al.*, 2000; Meyer *et al.*, 2000; Kühn, 2003, Braun und Slewinski, 2009).

Die Expressionsmuster der beiden in dieser Arbeit identifizierten Typ III-SUT von *G. biloba* (*GbSUT4*, Abbildung 3.10 E) und *M. kobus* (*MkSUT4*, Abbildung 3.14 D) unterscheiden sich deutlich voneinander und auch von anderen SUT4 aus Laubbaumarten, welche im Jahresgang untersucht wurden (Dobbelstein *et al.*, 2018). Diese Unterschiede lassen verschiedene Funktionen in beiden Baumarten vermuten, aber aufgrund fehlender Daten von Funktionscharakterisierung und Lokalisation bisher nicht belegen. In verschiedenen Pflanzenarten sind SUT4-Orthologe im Tonoplasten lokalisiert und in einigen Fällen auch in der Plasmamembran (Chincinska *et al.*, 2013). Im Tonoplasten regulieren sie die Saccharose-Konzentration im Cytosol durch den Export aus der Vakuole (Endler *et al.*, 2006; Payyavula *et al.*, 2011; Schneider *et al.*, 2012). In *Populus tremula x alba* wurde der Typ III-SUT im Blatt besonders stark exprimiert und aufgrund der höheren plasmodesmatischen Konnektivität zwischen Phloem- und Mesophyllzellen, sowie eines höheren Zuckergehalts in Baumblättern wird davon ausgegangen, dass hier die Diffusion von Saccharose vom Mesophyll zum Phloem durch PL die wichtigste Form der Phloembeladung ist. Eine Beeinträchtigung des Typ III-SUT in Pappel durch RNAi-Experimente führte zu einer Akkumulation von Saccharose in den *source*-Blättern, was bedeutete, dass er den Austritt von Saccharose aus den *source*-Blättern beeinflusst hat (Payyavula *et al.*, 2011). Für eine Funktion plasmamembran-lokalisierter Typ III-SUT nehmen Weise *et al.* (2000) nach Untersuchungen in Kartoffel und Tomate eine Beteiligung an der Wiederbeladung des Phloems oder der Aufnahme von Saccharose in *sink*-Zellen an.

#### 4.4.2 SUT-Expression und NSC-Gehalt

SUT verschiedener Typen wurden während der Jahreszeiten in *P. abies*, *G. biloba* und *M. kobus* auf unterschiedlichen Leveln exprimiert. Durch die Berechnung von Korrelationskoeffizienten sollten etwaige Zusammenhänge zwischen SUT-Expression und Saccharose-Gehalt aufgedeckt werden (Tabelle 4.2).

Die Expression von *PaSUT1* und *GbSUT1* und der Saccharose-Gehalt in Blättern, Rinde und Holz war entweder negativ oder nicht signifikant korreliert (Tabelle 4.2). Mit den aktuellen

Ergebnissen lässt sich nicht mit Sicherheit sagen, ob niedrigere Saccharose-Gehalte das Ergebnis einer hohen *SUT1*-Expression oder Aktivität sind oder ob niedrigere Saccharose-Gehalte zu einer höheren *SUT1*-Expression führen. Allerdings zeigten Vaughn *et al.* (2002) für den in den Geleitzellen lokalisierten SUT1 aus der Roten Beete (BvSUT1), dass es eine Saccharose-vermittelte transkriptionale Regulation der SUT-Aktivität im Phloem gibt. In ihrem Modell gehen sie davon aus, dass ein Saccharose-Sensor im Phloem auf einen erhöhten Saccharose-Gehalt reagiert und durch Herunterregulieren der Transkription des SUT-Gens, aufgrund des hohen SUT-mRNA- und -Protein-*turnovers*, die Phloembeladung direkt verringert wird.

**Tabelle 4.2: Korrelationskoeffizient nach Pearson zwischen SUT-Expression und dem Saccharose-Gehalt verschiedener Gewebe**

	<i>P. abies</i>		<i>G. biloba</i>		<i>M. kobus</i>	
	Pearson	<i>P</i> -Wert	Pearson	<i>P</i> -Wert	Pearson	<i>P</i> -Wert
SUT1 - Sac						
Blatt	-0,5	0,113	0,4	0,279		
Rinde	-0,7	<b>0,016</b>	0,3	0,308		
Holz	-0,9	<b>0,000</b>	-0,2	0,458		
Wurzel	-0,2	0,521	0,7	<b>0,006</b>		
SUT2 - Sac						
Blatt	0,3	0,270	0,3	0,511	-0,1	0,676
Rinde	-0,2	0,580	-0,5	0,092	0,9	<b>0,000</b>
Holz	-0,7	<b>0,009</b>	-0,7	<b>0,007</b>	0,3	0,368
Wurzel	-0,6	<b>0,042</b>	0,9	<b>0,000</b>	0,5	0,121
SUT4 - Sac						
Blatt			0,3	0,389	0,0	0,898
Rinde			0,2	0,544	0,9	<b>0,000</b>
Holz			-0,8	<b>0,003</b>	0,6	<b>0,029</b>
Wurzel			0,8	<b>0,000</b>	0,4	0,149
SUT1 - SUT2						
Blatt	0,5	0,069	1,0	<b>0,000</b>		
Rinde	0,5	0,082	-0,8	<b>0,001</b>		
Holz	0,9	<b>0,000</b>	0,0	0,929		
Wurzel	0,4	0,174	0,5	0,108		
SUT1 - SUT4						
Blatt			1,0	<b>0,000</b>		
Rinde			-0,3	0,342		
Holz			0,2	0,506		
Wurzel			0,7	<b>0,006</b>		
SUT2 - SUT4						
Blatt			1,0	<b>0,000</b>	0,2	0,512
Rinde			0,6	<b>0,035</b>	0,8	<b>0,004</b>
Holz			1,0	<b>0,000</b>	0,9	<b>0,000</b>
Wurzel			0,9	<b>0,000</b>	0,7	<b>0,012</b>

Für die Berechnung des Korrelationskoeffizienten wurden die Daten aus den Abb. 3.9, 3.10 und 3.14 verwendet. *P*-Werte < 0,05 sind fett gedruckt. Sac: Saccharose.

Das Expressionslevel von *PaSUT1* in den Nadeln sank von Jahreszeit zu Jahreszeit, auf den niedrigsten Wert im Winter (Abbildung 3.9 C), während der Zuckergehalt stieg (Abbildung 3.9 A). Die Nadeln enthielten den größten Teil der Kohlenhydrate und gelten das ganze Jahr über als die größten Kohlenhydratspeicher (Schaberg *et al.*, 2000). Im Winter zeigen Nadeln in kalten Klimazonen eine starke Abnahme ihrer photosynthetischen Kapazität, während sie sich in einem winterfesten Zustand befinden (Blehschmidt-Schneider *et al.*, 1997). Die daraus resultierende Reduzierung des Phloem-Transports und des Saccharose-Exports aus den Nadeln führt wiederum zu einer Akkumulation von Zuckern (Schaberg *et al.*, 2000), welche bei der Kältetoleranz eine Rolle spielen können (Wong *et al.*, 2003). Neben dem *SUT1* aus *P. abies* zeigte ebenso die Expression des *SUT2* eine teilweise signifikant negative Korrelation zum Saccharose-Gehalt in nahezu allen Organen.

Die Zuckergehalte in den Blättern der untersuchten Laubbäume *G. biloba* und *M. kobus* zeigten den erwarteten gaußförmigen Verlauf (Abbildung 3.9 A; 3.10 A und 3.14 A). Ein Rückgang des Zuckergehaltes in Oktober und November wurde durch die bevorstehende Wintersaison und Seneszenz ausgelöst. Sehr hohe Zuckergehalte in Wintergeweben wie in der Rinde und im Holz von *P. abies*, *G. biloba* und *M. kobus* sorgen für eine erhöhte Kälteverträglichkeit in dieser Jahreszeit (Siminovitch *et al.*, 1953). Bei Walnussbäumen waren die Zuckerkonzentrationen des Xylem-Saftes negativ mit der Lufttemperatur korreliert (Améglio *et al.*, 2004). Dies könnte auch für die erwähnten Baumarten der Fall sein (Abbildung 3.9 A; 3.10 A und 3.14 A). Ein Anstieg des Hexosegehaltes in Rinde und Holz durch den Abbau von Stärke im Winter war ebenfalls zu beobachten. Beim immergrünen Baum *G. gnemon*, der ganzjährig unter nahezu gleichbleibenden Bedingungen gehalten wurde, lag der Zuckergehalt in den Blättern das ganze Jahr über auf einem konstanten Niveau (Abbildung 3.12 A).

Die signifikant positive Korrelation der drei verschiedenen SUT aus *G. biloba* in den *source*-Blättern könnte ein Zusammenwirken an gemeinsamen physiologischen Prozessen oder Interaktionen untereinander bedeuten. Solche regulatorischen Interaktionen wurden bereits für die Transporter SUT1, SUT2 und SUT4 aus den Solanaceae Tomate, Kartoffel und Tabak diskutiert (Barker *et al.*, 2000). Dabei war die Hypothese, dass der SUT2 als Saccharose-Sensor fungieren und entweder mit einem hochaffinen Transporter mit geringer Transportkapazität (SUT1), oder mit einem niedrigaffinen Transporter mit hoher Transportkapazität (SUT4) interagieren und die relativen Aktivitäten dieser beiden Proteine regulieren kann (Weise *et al.*, 2000). Analysen möglicher Wechselwirkungen mit dem *split*-Ubiquitin-System in Hefezellen unterstützen diese Hypothese, da der SUT4 aus Tomate (LeSUT4) in der Lage war mit LeSUT1 zu interagieren (Reinders *et al.*, 2002). Daher schlossen auch Chincinska *et al.* (2008) eine posttranslationale Regulation durch Heterodimerisierung von StSUT1, dem Hauptphloembelader in der Kartoffel, und StSUT4, als Erklärung für den verstärkten Abtransport von Saccharose aus den Blättern in SUT4-RNAi-Pflanzen nicht aus. Allerdings wurden in den drei Solanaceae alle SUT in den Siebelementen lokalisiert. Ähnliche Co-

Lokalisationsanalysen wurden auch mit den Transportern aus *A. thaliana* AtSUC2, AtSUC3 und AtSUC4 durchgeführt und eine Interaktionsfähigkeit für alle drei Transporter gezeigt (Schulze *et al.*, 2003). Die Transporter sind jedoch nicht in denselben Zellen Co-lokalisiert, AtSUC2 befindet sich in den Geleitzellen (Stadler und Sauer, 1996), AtSUC3 in den Siebelementen (Meyer *et al.*, 2004) und AtSUC4 ist im Tonoplasten lokalisiert (Endler *et al.*, 2006).

#### 4.4.3 Einfluss von Licht auf NSC-Gehalt und SUT-Expression

Nachdem die Pflanzen für 48 h in die Dunkelheit versetzt wurden, begannen sowohl der Zucker- als auch der Stärkegehalt zu sinken, wobei der Rückgang der Stärke wesentlich deutlicher ausgeprägt war (Abbildung 3.15 A,B; 3.16 A,B; 3.17 A,B). Dies lässt sich mit einem Rückgang der Produktions- und Exportrate von Kohlenhydraten im bzw. aus dem Blatt erklären. Diese hängen in hohem Maße von dessen photosynthetischen Aktivität ab, die vom Licht als entscheidenden Faktor beeinflusst wird (Smith und Stitt, 2007). Ähnliche Ergebnisse wurden für Setzlinge verschiedener Angiospermen- und Gymnospermen-Baumarten, die über mehrere Wochen in völliger Dunkelheit gehalten wurden, erzielt (Piper und Fajardo 2016; Wiley *et al.*, 2017; Weber *et al.*, 2018). Das gleiche Bild zeigten Keimlinge von *Populus tremula* (Zitterpappel), die bis zum Tode in völliger Dunkelheit gehalten wurden. Sie enthielten keine Stärke mehr im Gewebe, aber es waren noch erhebliche Mengen an Zucker vorhanden (Wiley *et al.*, 2017). Das Phänomen, dass holzige Pflanzen oft keine NSC-Reserven nutzen, wurde bereits in der Literatur beschrieben (Chapin *et al.*, 1990; Dietze *et al.*, 2014).

Die Abnahme des Saccharose-Gehaltes bei den in dieser Arbeit untersuchten Baumarten war weniger stark ausgeprägt als bei krautigen Pflanzen. Bei Gerste und Spinat reduzierte sich nachts die Exportrate für Kohlenstoffe aus Blättern auf etwa 40 % des Wertes während des Tages und der Saccharose-Gehalt am Ende der Dunkelzeit betrug noch etwa 10 % desjenigen am Ende der Lichtperiode (Riens *et al.*, 1994). Bei den hier untersuchten Bäumen machte nach 48 h kontinuierlicher Dunkelheit der Saccharose-Gehalt noch 60-70 % des Gehaltes am Ende der Lichtperiode aus (Abbildung 3.15 A; 3.16 A; 3.17 A). Nachts nimmt der Stärkegehalt ab, da sowohl krautige Pflanzen, als auch Bäume Teile ihrer Kohlenhydratreserven für den Grundbedarf physiologischer Prozesse nutzen. Dabei wird diese zu Saccharose, Glukose und Fruktose abgebaut (Smith und Stitt, 2007). In *P. abies* und *M. kobus* war der Rückgang des Stärkegehalts auf etwa 10 % des Ausgangswertes im Licht, mit dem krautiger Pflanzen vergleichbar (Riens *et al.*, 1994). Bei *G. biloba* sank der Stärkegehalt allerdings nur auf etwa 40 % des Gehaltes am Ende der Lichtperiode ab (Abbildung 3.16 B). Im Vergleich zu den anderen analysierten Baumarten wies *G. biloba* den höchsten Stärkegehalt im Blatt auf und es ist möglich, dass 48 h Dunkelheit noch nicht ausreichten, um einen vergleichbar starken Stärkeverlust zu erleiden.

In den in dieser Arbeit durchgeführten Licht-Dunkel-Versuchen, bei denen die Bäume nach einer normalen Hell-Dunkelperiode (14 h Licht und 10 h Dunkelheit) für weitere 38 h in Dauerdunkelheit gehalten wurden, zeigte sich, dass die SUT teilweise unterschiedlich auf diese Bedingungen reagierten (Kapitel 3.6). Dass SUT je nach Pflanzenart in Abhängigkeit vom Licht entweder einer circadianen oder einer diurnalen Regulation folgen, wurde bereits in früheren Studien gezeigt. Chincinska *et al.* (2008) zeigten durch Expressionsanalysen aller drei SUT aus Kartoffel unter Dauerlicht, dass sie einer zirkadianen Regulation unterliegen, deren Amplitude für den *SUT1* während konstanter Dunkelheit sehr stark abnimmt. Wohingegen für die beiden SUT der Karotte (*Daucus carota*) eine diurnale Regulation beschrieben wurde (Shakya und Sturm, 1998). Die *SUT1* aus *P. abies* (PaSUT1) und *G. biloba* (GbSUT1) zeigten nach einem gaußförmigen Expressionsverlauf während des Tages eine deutlich verringerte Expression in konstanter Dunkelheit (Abbildung 3.15 C; 3.16 C). Im Falle von *GbSUT1* konnte das Transkript nach 48 h Dauerdunkelheit nicht mehr nachgewiesen werden. Die Ergebnisse zeigen eine diurnale Regulation des *SUT1* beider Gymnospermen. Ein Absinken der SUT1-mRNA- und Proteinwerte nach 15 h Dunkelheit wurde das erste Mal für den SUT1 aus Kartoffel demonstriert (Kühn *et al.*, 1997). Dieser lichtabhängige *turnover* korreliert mit der täglichen Regulierung des Zuckerexportes aus Blättern (Heineke *et al.*, 1994). *PaSUT2* zeigt ebenfalls eine diurnale Regulation, aber der Rückgang der Expression im Dauerdunkeln war vergleichsweise weniger stark (Abbildung 3.15 D).

Der *SUT2* aus Ginkgo (GbSUT2) und Magnolie (MkSUT2) zeigten wie die zuvor beschriebenen SUT eine diurnale Regulation. Im Gegensatz zu *GbSUT2*, der in Dauerdunkelheit eine sukzessive Abnahme der Expression zeigte (Abbildung 3.16 D), lag das Expressionsniveau von *MkSUT2* während der Dauerdunkelheit nahezu konstant auf dem Level desjenigen am Ende der Lichtperiode (Abbildung 3.17 C). Die Expression des *SUT4* aus Ginkgo ging in der Dunkelheit nur minimal zurück und zeigte eine eher circadiane Regulation. Aufgrund der hohen *turnover*-Rate von SUT-mRNA von 60-130 min und der Halbwertszeit von SUT-Proteinen von weniger als 4 h (Vaughn *et al.*, 2002), müsste diese in beiden Baumarten auch in Dunkelheit ständig neu gebildet werden oder die Transkriptstabilität posttranskriptional erhöht werden. Letzteres wurde für den *SUT4* aus Kartoffel (StSUT4) gezeigt (Liesche *et al.*, 2011b). Für StSUT4 wurde weiterhin gezeigt, dass er in Verbindung mit Phytochrom B an der Wahrnehmung von Licht beteiligt ist (Chincinska *et al.*, 2008). Daher wäre eine Beteiligung an Lichtsensor-Reaktionen von GbSUT4 bzw. MkSUT2 durchaus denkbar.

Die Expression von *MkSUT4* nimmt im Dauerdunkeln kontinuierlich signifikant ab (Abbildung 3.17 D). Ein solches Verhalten wurde sowohl für den *SUT4* aus *F. sylvatica* und *Q. robur* (Dobbelstein *et al.*, 2018), als auch den *SUT4* aus Pappel (PtaSUT4) beschrieben (Xu *et al.*, 2018). Im Gegensatz zu den beiden zuvor genannten Baumarten handelt es sich bei der Pappel um einen nachweislich passiv-symplastischen Phloembelader (Payyavula *et al.*, 2011).

Dort reguliert PtaSUT4 die Saccharose-Konzentration im Cytosol der Blattmesophyllzellen, indem er den Austausch mit der Vakuole kontrolliert. So wird der Saccharose-Gradient entlang des *pre-phloem*-Pfades beeinflusst, der die Rate der Phloembeladung bestimmt (Liesche, 2017).

#### 4.5 Phloembeladung bei Gymnospermen – Fazit und Ausblick

Die Einteilung des Phloems in einen offenen bzw. geschlossenen Typ aufgrund der Anzahl von Plasmodesmata zwischen den verschiedenen Zelltypen des Phloems (Gamalei, 1989), ein vergleichsweise geringer Turgor in den Siebelementen, sowie eine höhere Osmolarität in den Blättern, führte für Bäume zur Annahme einer passiven symplastischen Beladung durch Diffusion (Turgeon und Medville, 1998; Rennie und Turgeon, 2009; Turgeon, 2010a; Turgeon 2010b; Turgeon und Medville, 2010; Davidson *et al.*, 2011; Fu *et al.*, 2011). Bei Gymnospermen wird aufgrund der zuvor beschriebenen Ergebnisse für Angiospermen-Baumarten sowie der Kontinuität der symplastischen Verbindungen vom Mesophyll bis zu den Siebelementen in ausgewachsenen Nadeln und Blättern (Blehschmidt Schneider *et al.*, 1997; Liesche und Schulz 2012; 2013) ebenfalls eine passive Phloembeladung angenommen, da diese Art der Beladung als ursprünglich angesehen wird (Liesche *et al.*, 2011a; De Schepper *et al.*, 2013). Allerdings ist zum Mechanismus der Phloembeladung und des -transports bisher kaum etwas bekannt (Schulz 1992, 2005; Glockmann und Schulz, 1999; Liesche *et al.*, 2011a).

In den drei hier untersuchten Gymnospermen *P. abies*, *G. biloba* und *G. gnemon* wurden in TEM-Aufnahmen plasmodesmatische Verbindungen zwischen Transfusionsparenchym, Bündelscheidenzellen, sowie den Strasburger-Zellen und ihren Siebzellen gefunden. Wie zuvor diskutiert wurde, ist sowohl das Vorhandensein von Plasmodesmata, als auch deren Anzahl kein ausschlaggebendes Kriterium für oder gegen eine passive Phloembeladung. Die Aufnahmen zeigen aber, dass eine aktive symplastische Beladung durch *polymer-trapping* für Gymnospermen nicht in Frage zu kommen scheint, da keine speziellen Geleitzellen zur Synthese von Oligosacchariden der Raffinosefamilie (RFO) gefunden werden konnten. Des Weiteren konnten keine RFO in Blättern und Nadeln nachgewiesen werden.

Die Expression und Lokalisation der beiden *SUT* in der Nadel von *P. abies* lässt die Annahme zu, dass es einen aktiven Saccharose-Transport im *pre-phloem-pathway*, sowie eine aktive Phloembeladung gibt. Obwohl dies noch nicht systematisch untersucht wurde, scheinen Gymnospermen ausschließlich Saccharose im Phloem zu transportieren (Shiroya *et al.*, 1962; Willenbrink und Kollmann, 1966; Willenbrink, 2002). Dies konnte für *P. abies* bereits 1959 von Ziegler und Mittler durch die Verwendung phloemsaugender Aphiden gezeigt werden. Die Annahme einer aktiven Phloembeladung wird durch die Lokalisation von *PaSUT2* im Phloem unterstützt. Durch die subzelluläre Lokalisation von *PaSUT1* im Tonoplasten und des fehlenden Nachweises eines *SUT*-Typ III in Koniferen könnte er die Saccharose-Konzentration im

Cytosol durch den Austausch mit der Vakuole kontrollieren und so die Rate der Phloembeladung beeinflussen. Ob PaSUT1 exklusiv im Tonoplasten lokalisiert ist oder zusätzlich an einer Plasmamembran, könnte durch weitere Lokalisationsexperimente geklärt werden. Innerhalb des Transfusionsparenchyms könnte PaSUT1 auch an der Rückgewinnung von Saccharose aus dem Transpirationsstrom oder dem Transport von Saccharose in Richtung Phloem über das Endoplasmatische Retikulum beteiligt sein.

In Bezug auf die beiden Laubblatt-tragenden Gymnospermen *G. biloba* und *G. gnemon* können hingegen noch keine genaueren Aussagen zum Phloembeladungs-Mechanismus getroffen werden. Obwohl in *G. biloba* die Expression von je einem SUT der drei Typen nachgewiesen werden konnte, war die biochemische Charakterisierung der Transporter mittels Hefekomplementation bisher nicht erfolgreich. Deshalb sollte die Messung zukünftig mit dem neu entwickelten Protoplasten-Esculin-Assay in *A. thaliana* durchgeführt werden (Rottmann *et al.*, 2018). Des Weiteren müssen die SUT entweder mit der *in-situ*-Hybridisierung oder durch den Einsatz spezifischer Antikörper lokalisiert werden.

Im Vergleich zu *G. biloba*, wo eine Bestimmung der Verteilung der Photoassimilate in den subzellulären Kompartimenten von Mesophyllzellen der *source*-Blätter aufgrund des hohen Gehaltes an Flavonoidglykosiden, Terpenlaktone und polyphenolischen Sekundärmetaboliten (Wang *et al.*, 2005) bisher nicht erfolgreich war, konnte diese für *G. gnemon* durchgeführt werden. Die subzelluläre Zuckerverteilung und die Konzentrationen waren in dieser Gymnosperme ähnlich der Verteilungen zu der anderer Angiospermen-Baumarten, die mit der apoplastischen Phloembeladung assoziiert werden (Öner-Sieben und Lohaus, 2014; Fink *et al.*, 2018). Im Gegensatz zur basalen Angiosperme *M. kobus* war es noch nicht möglich, Phloemsaft von *G. biloba* und *G. gnemon* mit der Laser-Aphid-Technik zu sammeln, aber unter der Annahme, dass die Phloemkonzentration in dieser Baumart ähnlich ist wie in anderen Baumarten, wäre auch die Saccharose-Konzentration im Phloem höher als im Cytosol von Mesophyllzellen. Die Hypothese, dass bei *G. gnemon* ebenfalls aktive Schritte an der Phloembeladung beteiligt sind, wird durch die verminderte Zuckerausscheidung aus PCMBS-behandelten angeschnittenen Blättern unterstützt (Fink *et al.*, 2018).

Alle bisher in der Literatur beschriebenen Gymnospermen haben die gleiche funktionelle Anatomie: Die Siebzellen sind nicht mit Geleitzellen assoziiert, sondern mit Strasburger-Zellen, die ontogenetisch nicht verwandt sind. Die Leitbündel in den Blättern aller Gymnospermen werden durch das Transfusionsgewebe und durch eine endodermisähnliche Bündelscheide vom Mesophyll getrennt. All diese Besonderheiten deuten darauf hin, dass Gymnospermen einen ähnlichen Phloembeladungs-Mechanismus aufweisen könnten, unabhängig davon, ob sie Nadeln, Schuppen oder Blätter haben. Das Verständnis der Mechanismen der Phloembeladung in Gymnospermen kann Erkenntnisse für die Entwicklung und Bedeutung von Ferntransportmechanismen in Landpflanzen liefern (Liesche *et al.*, 2011; Liesche, 2017).

## Literaturverzeichnis

- Altschul S**, Gish W, Miller W, Myers E, Lipman D. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* **215**, 403–410.
- Améglio T**, Decourteix M, Alves G, Valentin V, Sakr S, Julien J, Petel G, Guilliot A, Lacoïnte A. 2004. Temperature effects on xylem sap osmolarity in walnut trees: evidence for a vitalistic model of winter embolism repair. *Tree Physiology* **24**, 785–793.
- Armenise L**, Simeone M, Piredda R, Schirone B. 2012. Validation of DNA barcoding as an efficient tool for taxon identification and detection of species diversity in Italian conifers. *European Journal of Forest Research* **131**, 1337–1353.
- Atkins C**, Smith P, Rodriguez-Medina C. 2011. Macromolecules in phloem exudates—a review. *Protoplasma* **248**, 165–172.
- Baker R**, Leach K, Braun D. 2012. SWEET as sugar: new sucrose effluxers in plants. *Molecular Plant* **5**, 766–768.
- Barker L**, Kühn C, Weise A, Schulz A, Gebhardt C, Hirner B, Hellmann H, Schulze W, Ward J, Frommer W. 2000. SUT2, a putative sucrose sensor in sieve elements. *The Plant Cell* **12**, 1153–1164.
- Barth I**, Meyer S, Sauer N. 2003. PmSUC3: characterization of a SUT2/ SUC3-type sucrose transporter from *Plantago major*. *The Plant Cell* **15**, 1375–1385.
- Beebe DU**, Russin WA. 1999. Plasmodesmata in the phloem- loading pathway. In: Plasmodesmata: Structure, Function, Role in Cell Communication, S., A. J. E. van Bel and W. J. P. van Kesteren, Springer 261–293.
- Bertani, G.** 1951. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **62** (3), 293–300.
- Blechsmidt Schneider S**, Eschrich W, Jahnke S. 1997. Phloem loading and assimilate transport. In: *Trees: Contributions to Modern Tree Physiology*, **581**, 139–163.
- Boorer KJ**, Loo DDF, Frommer WB, Wright EM. 1996. Transport mechanism of the cloned potato H<sup>+</sup>/sucrose cotransporter StSUT1. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 25139–25144.
- Bowe LM**, Coat G, dePamphilis CW. 2000. Phylogeny of seed plants based on all three genomic compartments: extant gymnosperms are monophyletic and Gnetales' closest relatives are conifers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **97**, 4092–4097.
- Bradford M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248–254.
- Braukmann TW**, Kuzmina M, Stefanovic S. 2009. Loss of all plastid ndh genes in Gnetales and conifers: extent and evolutionary significance for the seed plant phylogeny. *Current Genetics* **55**, 323–337.
- 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. *Strasburger – Lehrbuch der Botanik*. 36. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Buchan DWA**, Jones DT. 2019. The PSIPRED Protein Analysis Workbench: 20 years on. *Nucleic Acids Research* **47** (W1), W402–W407.
- Burleigh JG**, Mathews S. 2004. Phylogenetic signal in nucleotide data from seed plants: implications for resolving the seed plant tree of life. *American Journal of Botany* **91**, 1599–1613.
- Bush DR**. 1990. Electrogenicity, pH-dependence, and stoichiometry of the proton-sucrose symport. *Plant Physiology* **93**, 1590–1596.
- Byrne D**, Miller W. 1990. Carbohydrate and Amino-acid-composition of Phloem Sap and Honeydew Produced By *Bemisia-tabaci*. *Journal of Insect Physiology* **36**, 433–439.
- 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 Phytologist* **123** (2), 227–232.
- Cao T**, Lahiri I, Singh V, Louis J, Shah J, Ayre B. 2013. Metabolic engineering of raffinose-family oligosaccharides in the phloem reveals alterations in carbon partitioning and enhances resistance to green peach aphid. *Frontiers in Plant Science* **4**, 263.
- Carde JP**. 1974. Le tissu de transfert (=cellules de Strasburger) dans les aiguilles du pin maritime (*Pinus pinaster* Ait.), II. Caractères cytochimiques et infrastructuraux de la paroi et des plasmodesmes. *Journal of Microscopy* **20**, 51–72.
- Carpaneto A**, Geiger D, Bamberg E, Sauer N, Fromm J, Hedrich R. 2005. Phloem-localized, proton-coupled sucrose carrier ZmSUT1 mediates sucrose efflux under the control of the sucrose gradient and the proton motive force. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 21437–21443.
- Chang S**, Puryear J, Cairney J. 1993. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Molecular Biology Reporter* **11**, 113–116.
- Chapin FS**, Schulze ED, Mooney HA. 1990. The ecology and economics of storage in plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* **21**, 423–444.
- Chaw SM**, Zharkikh A, Sung HM, Lau TC, Li WH. 1997. Molecular phylogeny of extant gymnosperms and seed plant evolution: analysis of nuclear 18S rRNA sequences. *Molecular Biology and Evolution* **14**, 56–68.
- Chen L**, Qu X, Hou B, Sosso D, Osorio S, Fernie A, Frommer W. 2012. Sucrose efflux mediated by SWEET proteins as a key step for phloem transport. *Science* **335**, 207–211.
- Chincinska I**, Gier K, Krügel U, Liesche J, He H, Grimm B, Harren FJ, 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 I**, Liesche J, Krügel U, Michalska J, Geigenberger P, Grimm B, Kühn C. 2008. Sucrose transporter StSUT4 from potato affects flowering, tuberization, and shade avoidance response. *Plant Physiology* **146**, 515–528.

- Christenhusz MJM**, Reveal JL, Farjon A, Gardner MF, Mill RR, Chase MW. 2011. A new classification and linear sequence of extant gymnosperms. *Phytotaxa* **19**, 55–70.
- Crepeau MW**, Langley CH, Stevens KA. 2017. From Pine Cones to Read Clouds: Rescaffolding the Megagenome of Sugar Pine (*Pinus lambertiana*). *G3* **7** (5), 1563–1568.
- Davidson A**, Keller F, Turgeon R. 2011. Phloem loading, plant growth form, and climate. *Protoplasma* **248**, 153–163.
- De Schepper V**, De Swaef T, Bauweraerts I, Steppe K. 2013. Phloem transport: a review of mechanisms and controls. *Journal of Experimental Botany* **64**, 4839–4850.
- Decourteix M**, Alves G, Brunel N, Améglio T, Guillio A, Lemoine R, Pétel G, Sakr S. 2006. JrSUT1, a putative xylem sucrose transporter, could mediate sucrose influx into xylem parenchyma cells and be up-regulated by freeze-thaw cycles over the autumn-winter period in walnut tree (*Juglans regia* L.). *Plant, Cell and Environment* **29**, 36–47.
- Delrot S**, Bonnemain JL. 1981. Involvement of protons as substrate for the sucrose carrier during phloem loading in *Vicia faba*. *Plant Physiology*. **67**, 560–564.
- Dietze MC**, Sala A, Carbone MS, Czimczik CI, Mantooth JA, Richardson AD, Vargas R. 2014. Nonstructural carbon in woody plants. *Annual Review of Plant Biology* **65**, 667–687.
- 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** (2), 284–299.
- Dobbelstein E**. 2019. Zuckertransport und Phloembeladung in Fagaceae und Salicaceae. *Dissertation*, Bergische Universität Wuppertal.
- Doyle JA**. 1998. Phylogeny of vascular plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* **29**, 567–599.
- Eckardt NA**. 2003. The Function of SUT2/SUC3 Sucrose Transporters: The Debate Continues. *The Plant Cell* **14**, 1259–1262.
- Endler A**, Meyer S, Schelbert S, Schneider T, Weschke W, Peters S, Keller F, Baginsky S, Martinoia E, Schmidt U. 2006. Identification of a vacuolar sucrose transporter in barley and *Arabidopsis* mesophyll cells by a tonoplast proteomic approach. *Plant Physiology* **141**, 196–207.
- Esau K**, Evert RF, Eichhorn SE. 2006. Esau's Pflanzenanatomie. Meristeme, Zellen und Gewebe der Pflanzen - ihre Struktur, Funktion und Entwicklung. 3. Auflage. *De Gruyter*.
- Esau K**. 1965. Plant anatomy, 2nd edition. *Wiley* 767.
- Fink D**, Dobbelstein E, Barbian A, Lohaus G. 2018. Ratio of sugar concentrations in the phloem sap and the cytosol of mesophyll cells in different tree species as an indicator of the phloem loading mechanism. *Planta* **248**, 661–673.
- Flemetakis E**, Dimou M, Cotzur D, Efrose RC, Aivalakis G, Colebatch G, Udvardi M, Katinakis P. 2003. A sucrose transporter, LjSUT4, is up-regulated during *Lotus japonicus* nodule development. *Journal of Experimental Botany*. **54**, 1789–1791.
- Fondy B**, Geiger D. 1977. Sugar Selectivity and Other Characteristics of Phloem Loading in *Beta vulgaris* L. *Plant Physiology* **59**, 953–960.

- 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.
- Gadek PA**, Quinn CJ. 1988. Pitting of transfusion tracheids in cupressaceae. *Australian Journal of Botany* **36** (1), 81–92.
- Gamalei Y**. 1989. Structure and function of leaf minor veins in trees and herbs. A taxonomic review. *Trees - Structure and Function* **3**, 96–110.
- Gamalei Y**. 1991. Phloem Loading and Its Development Related to Plant Evolution From Trees To Herbs. *Trees - Structure and Function* **5**, 50–64.
- Gerhardt R**, Heldt H. 1984. Measurement of subcellular metabolite levels in leaves by fractionation of freeze-stopped material in nonaqueous media. *Plant Physiology* **75**, 542–547.
- Giaquinta R**. 1976. Evidence for Phloem Loading from the Apoplast. *Plant Physiology* **57**, 872–875.
- Glockmann C**, Kollmann R. 1996. Structure and development of cell connections in the phloem of *Metasequoia glyptostroboides* needles. 1. Ultrastructural aspects of modified primary plasmodesmata in Strasburger cells. *Protoplasma* **193**, 191–203
- Glockmann C**, Schulz A. 1999. Phloem loading and transport in gymnosperms: an enigma. In: International conference on assimilate transport and partitioning, Newcastle, Australia, August 15–20 1999. Abstract 7-07, p. 99.
- Goggin F**, Medville R, Turgeon R. 2001. Phloem loading in the tulip tree. Mechanisms and evolutionary implications. *Plant Physiology* **125**, 891–899.
- 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** (25), 13979–13984.
- Guan R**, Zhao Y, Zhang H, Fan G, Liu X, Zhou W, Shi C, Wang J, Liu W, Liang X, Fu Y, Ma K, Zhao L, Zhang F, Lu Z, Lee SM, Xu X, Wang J, Yang H, Fu C, Ge S, Chen W. 2016 Draft genome of the living fossil *Ginkgo biloba*. *GigaScience* **5**:49.
- Hackel A**, Schauer N, Carrari F, Fernie AR, Grimm B, Kühn C. Sucrose transporter LeSUT1 and LeSUT2 inhibition affects tomato fruit development in different ways. *The Plant Journal* **45** (2), 180–192.
- Hafke**, JB, van Amerongen JK, 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.
- Hall T**. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* **41**, 95–98.
- Hanahan D**. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology* **166**, 557–580.
- Haritatos E**, Keller F, Turgeon R. 1996. Raffinose oligosaccharide concentrations measured in individual cell and tissue types in *Cucumis melo* L. leaves: Implications for phloem loading. *Planta* **198**, 614–622.

- Heineke D**, Kruse A, Flügge UI, Frommer WB, Riesmeier W, Willmitzer L, Heldt HW. 1994. Effect of antisense repression of the chloroplast triose-phosphate translocator on photosynthetic metabolism in transgenic potato plants. *Planta* **193** (2), 174–180.
- Hori H**, Lim BL, Osawa S. 1985. Evolution of green plants as deduced from 5S rRNA sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **82**, 820–823.
- Karlgren A.**, Carlsson J., Gyllenstrand N., Lagercrantz U., Sundström JF. 2009. Non-radioactive in situ hybridization protocol applicable for Norway spruce and a range of plant species. *Journal of visualized experiments* :**26**, 1205.
- Karnovsky MJ**. 1965 A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron-microscopy. *Journal of Cell Biology*, **27**, 137-138A.
- King RW**, Zeevaart JA. (1974). Enhancement of Phloem exudation from cut petioles by chelating agents. *Plant physiology* **53** (1), 96–103.
- 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, Grotemeyer MS, Rentsch D. 2012. Determinants for *Arabidopsis* peptide transporter targeting to the tonoplast or plasma membrane. *Traffic* **13** (8), 1090–1105.
- Komor E**, Rotter M, Tanner W. 1977. A proton-cotransport system in a higher plant: Sucrose transport in *Ricinus communis*. *Plant Science Letters* **9** (2), 153–162.
- Kubista M**, Andrade J, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, Sindelka R, Sjöback R, Sjögreen B *et al.* 2006. The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine* **27**, 95–125.
- Kühn C**, Grof C. 2010. Sucrose transporters of higher plants. *Current Opinion in Plant Biology* **13**, 288–298.
- Kühn C**, Hajirezaei M, Fernie A, Rössner-Tunali U, Czechowski T, Hirner B, Frommer W. 2003. The sucrose transporter StSUT1 localizes to sieve elements in potato tuber phloem and influences tuber physiology and development. *Plant Physiology* **131**, 102–113.
- Kühn C**. 2003. A comparison of the sucrose transporter systems of different plant species. *Plant Biology* **5**, 215–232.
- 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**, Tegeder M, Throne-Holst M, Frommer W, Patrick J. 2003. Phloem loading and unloading of sugars and amino acids. *Plant, Cell and Environment* **26**, 37–56.
- Laur J**, Hacke U.G. 2014. Exploring *Picea glauca* aquaporins in the context of needle water uptake and xylem refilling. *New Phytologist* **203**, 388–400.
- Lazzaro MD**, Thomson WW. 1996. The vacuolar-tubular continuum in living trichomes of chickpea (*Cicer arietinum*) provides a rapid means of solute delivery from base to tip. *Protoplasma* **193**, 181–190.
- Lederer B**. 1955. Vergleichende Untersuchungen über das Transfusionsgewebe einiger rezenter Gymnospermen. In: Huber B (ed) Vergleichend-anatomische Untersuchungen. *Gustav Fischer*, 1–42.

- 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**. 2000. Sucrose transporters in plants: update on function and structure. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* **1465**, 246–262.
- Li C**, Weiss D, Goldschmidt E. 2003. Effects of carbohydrate starvation on gene expression in citrus root. *Planta* **217**, 11–20.
- Liesche J**, Krügel U, He H, Chincinska I, Hackel A, Kühn C. 2011b. Sucrose transporter regulation at the transcriptional, post-transcriptional and post-translational level. *Journal of Plant Physiology* **168** (2), 1426–1433.
- Liesche J**, Martens H, Schulz A. 2011a. 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**, 355–65.
- 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**, Schulz A. 2013. Modeling the parameters for plasmodesmal sugar filtering in active symplasmic phloem loaders. *Frontiers in Plant Science* **4**, 207.
- Liesche J**. 2017. Sucrose transporters and plasmodesmal regulation in passive phloem loading. *Journal of Integrative Plant Biology* **59**, 311–321.
- Lohaus G**, Burba M, Heldt H. 1994. Comparison of the Contents of Sucrose and Amino-acids In the Leaves, Phloem Sap and Taproots of High and Low Sugar-producing Hybrids of Sugar-beet (*Beta vulgaris* L). *Journal of Experimental Botany* **45**, 1097–1101.
- Lohaus G**, Moellers C. 2000. Phloem transport of amino acids in two *Brassica napus* L. genotypes and one *B. carinata* genotype in relation to their seed protein content. *Planta* **211**, 833–840.
- Lohaus G**, Winter H, Riens B, Heldt H. 1995. Further-studies of the Phloem Loading Process in Leaves of Barley and Spinach - the Comparison of Metabolite Concentrations In the Apoplastic Compartment With Those In the Cytosolic Compartment and In the Sieve Tubes. *Botanica Acta* **108**, 270–275.
- Magallon S**, Hilu KW, Quandt D. 2013. Land plant evolutionary timeline: gene effects are secondary to fossil constraints in relaxed clock estimation of age and substitution rates. *American Journal of Botany* **100**, 556–573.
- Mahboubi A**, Ratke C, Gorzsás A, Kumar M, Mellerowicz EJ, Niittylä T. 2013. Aspen SUCROSE TRANSPORTER 3 Allocates Carbon into Wood Fibers. *Plant Physiology* **163**, 1729–1740.
- Marger M**, Saier M. 1993. A major superfamily of transmembrane facilitators that catalyse uniport, symport and antiport. *Trends in Biochemical Sciences* **18**, 13–20.
- Mathews S**. 2009. Phylogenetic relationships among seed plants: persistent questions and the limits of molecular data. *American Journal of Botany* **96**, 228–236.

**Meyer S**, Lauterbach C, Niedermeier M, Barth I, Sjolund RD, Sauer N. 2004. Wounding enhances expression of AtSUC3, a sucrose transporter from Arabidopsis sieve elements and sink tissues. *Plant Physiology* **134** (2), 684–693.

**Meyer S**, Melzer M, Truernit E, Hümmer C, Besenbeck R, Stadler R, Sauer N. 2000. AtSUC3, a gene encoding a new *Arabidopsis* sucrose transporter, is expressed in cells adjacent to the vascular tissue and in a carpel cell layer. *The Plant Journal* **24**, 869–882.

**Minchin PEH**, Thorpe MR. 1987. Measurement of unloading and reloading of photo-assimilates within the stem of bean. *Journal of Experimental Botany* **38**, 211–220.

**Mohanta TK**, Occhipinti A, Atsbaha Zebelo S, Foti M, Fliegmann J, Bossi S, Maffei ME, Berteau CM. *Ginkgo biloba* responds to herbivory by activating early signaling and direct defenses. *PLoS One.* ;**7** (3).

**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, Grivet D, Gut M, Hansen OK, Heer K, Kaya Z, Krutovsky KV, Kersten B, Liepelt S, Opgenoorth L, Sperisen C, Ullrich KK, Vendramin GG, Westergren M, Ziegenhagen B, Alioto T, Gugerli F, Heinze B, Höhn M, Troggio M, Neale DB. 2019. A Reference Genome Sequence for the European Silver Fir (*Abies alba* Mill.): A Community-Generated Genomic Resource. *G3*.

**Münch E**. 1930. Die Stoffbewegungen in der Pflanze. *Gustav Fischer*, Jena.

**Murray BG**. 2013. Karyotype variation and evolution in gymnosperms. In: Greilhuber, J., Dolezel, J., Wendel, J.F. (Eds.), *Plant Genome Diversity* Springer Vienna, **2**, 231–243.

**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.

**Neale DB**, McGuire PE, Wheeler NC, Stevens KA, Crepeau MW, Cardeno C, Zimin AV, Puiu D, Perteau GM, Sezen UU, Casola C, Koralewski TE, Paul R, Gonzalez-Ibeas D, Zaman S, Cronn R, Yandell M, **Holt C**, Langley CH, Yorke JA, Salzberg SL, Wegrzyn JL. 2017. The Douglas-Fir Genome Sequence Reveals Specialization of the Photosynthetic Apparatus in Pinaceae. *G3* **7** (9), 3157–3167.

**Nystedt B**, Street NR, Wetterbom A, Zuccolo A, Lin YC, Scofield DG, Vezzi F, Delhomme N, Giacomello S, Alexeyenko A, Vicedomini R, Sahlin K, Sherwood E, Elfstrand M, Gramzow L, Holmberg K, Hällmann J, Keech O, Klasson L, Koriabine M, Kucukoglu M, Käller M, Luthmann J, Lysholm F, Niittyta T, Olson A, Rilakovic N, Ritland C, Rossello JA, Sena J, Svensson T, Talavera-Lopez C, Theißen G, Tuominen H, Vannesta K, Wu ZQ, Zhang B, Zerbe P, Arvestad L, Bhalerao R, Bohlmann J, Bousquet J, Gil RG, Hvidsten TR, de Jong P, MacKay J, Morgante M, Ritland K, Sundberg B, Thompson SL, Van de Peer Y, Andersson B, Nilsson O, Ingvarsson PK, Lundeberg J, Jansson S 2013. The Norway spruce genome sequence and conifer genome evolution. *Nature* **497**, 579–584.

**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 Section C - A Journal Of Biosciences* **63**, 574–582.

- Öner-Sieben S**, Lohaus G. 2014. Apoplastic and symplastic phloem loading in *Quercus robur* and *Fraxinus excelsior*. *Journal of Experimental Botany* **65**, 1905–1916.
- 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 L**, Palmer L, Pritchard J, Graham R, Stangoulis J. 2013. Improved techniques for measurement of nanolitre volumes of phloem exudate from aphid stylectomy. *Plant Methods* **9**, 18.
- Payyavula RS**, Tay KH, Tsai CJ, Harding SA. 2011. The sucrose transporter family in *Populus*: the importance of a tonoplast PtaSUT4 to biomass and carbon partitioning. *The Plant Journal* **65**, 757–770.
- Peng D**, Gu X, Xue LJ, Leebens-Mack JH, Tsai CJ. 2014. Bayesian phylogeny of sucrose transporters: ancient origins, differential expansion and convergent evolution in monocots and dicots. *Frontiers in Plant Science* **5**, 615.
- Pfaffl M**, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians T. 2004. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper–Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology Letters* **26**, 509–515.
- Piper FI**, Fajardo A. 2016. Carbon dynamics of *Acer pseudoplatanus* seedlings under drought and complete darkness. *Tree Physiology* **36**, 1400–1408.
- Ran JH**, Gao H, Wang XQ. 2010. Fast evolution of the retroprocessed mitochondrial rps3 gene in Conifer II and further evidence for the phylogeny of gymnosperms. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **54**, 136–149.
- 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, Ward JM. 2012. Evolution of plant sucrose uptake transporters. *Frontiers in Plant Science* **3**, 22.
- Rennie EA**, Turgeon R. 2009. A comprehensive picture of phloem loading strategies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **106**, 14162–14167.
- Riens B**, Lohaus G, Heineke D, Heldt HW. 1991. Amino acid and sucrose content determined in the cytosolic, chloroplastic, and vacuolar compartments and in the phloem sap of spinach leaves. *Plant Physiology* **97**, 227–233.
- Riens B**, Lohaus G, Winter H, Heldt HW. 1994. Production and diurnal utilization of assimilates in leaves of spinach (*Spinacia oleracea* L.) and barley (*Hordeum vulgare* L.). *Planta* **192**, 497–501.
- Riesmeier J**, Hirner B, Frommer W. 1993. Potato sucrose transporter expression in minor veins indicates a role in phloem loading. *The Plant Cell* **5**, 1591–1598.
- Riesmeier J**, Willmitzer L, Frommer W. 1992. Isolation and characterization of a sucrose carrier cDNA from spinach by functional expression in yeast. *EMBO Journal* **11**, 4705–4713.
- Riesmeier J**, Willmitzer L, Frommer W. 1994. Evidence for an essential role of the sucrose transporter in phloem loading and assimilate partitioning. *EMBO Journal*. **13**, 1–7.

- Ririe K**, Rasmussen R, Wittwer C. 1997. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry* **245**, 154–160.
- Roberts AG**. 2005. Plasmodesmal structure and development. In: Oparka K (ed) *Plasmodesmata*. Blackwell, Oxford, 1–32.
- 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.
- Rottmann TM**, Zierer W, Subert C, Sauer N, Stadler R. 2016. STP10 encodes a high-affinity monosaccharide transporter and is induced under low glucose conditions in pollen tubes of *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* **67**, 2387–2399.
- Roure B**, Baurain D, Philippe H. 2013. Impact of missing data on phylogenies inferred from empirical phylogenomic data sets. *Molecular Biology and Evolution* **30**, 197–214.
- Russin W**, Evert RF. 1985. Studies On the Leaf of *Populus Deltoides* (Salicaceae) - Ultrastructure, Plasmodesmatal Frequency, and Solute Concentrations. *American Journal of Botany* **72**, 1232–1247.
- Salas-Leiva DE**, Meerow AW, Calonje M, Griffith MP, Francisco-Ortega J, Nakamura K, Stevenson DW, Lewis CE, Namoff S. 2013. Phylogeny of the cycads based on multiple single-copy nuclear genes: congruence of concatenated parsimony, likelihood and species tree inference methods. *Annals of Botany* **112**, 1263–1278.
- Sauer N**, Ludwig A, Knoblauch A, Rothe P, Gahrtz 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* **40**, 120–130.
- Sauer N**, Stadler R. 1993. A sink-specific HC/monosaccharide co-transporter from *Nicotiana tabacum*: cloning and heterologous expression in baker's yeast. *The Plant Journal* **4**, 601–610.
- Sauer N**, Stolz J. 1994. SUC1 and SUC2: two sucrose transporters from *Arabidopsis thaliana*; expression and characterization in baker's yeast and identification of the histidine-tagged protein. *The Plant Journal* **6**, 67–77.
- Sauer N**. 2007. Molecular physiology of higher plant sucrose transporters. *FEBS Lett* **581**, 2309–2317.
- Schaberg PG**, Snyder MC, Shane JB, Donnelly JR. 2000. Seasonal pattern of carbohydrate reserve in spruce seedlings. *Tree Physiology* **20**, 549–555.
- Schneider S**, Hulpke S, Schulz A, Yaron I, Höll J, Imlau A, Schmitt B, Batz S, Wolf S, Hedrich R, Sauer N. 2012. Vacuoles release sucrose via tonoplast-localised SUC4-type transporters. *Plant Biology* **14**, 325–336.
- Schneidereit A**, Scholz-Starke J, Sauer N, Büttner M. 2005. AtSTP11, a pollen tube-specific monosaccharide transporter in *Arabidopsis*. *Planta* **221** (1), 48–55.
- 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* **68**, 129–136.

- Schulz A.** 1992. Living sieve cells of conifers as visualized by confocal, laser-scanning fluorescence microscopy. *Protoplasma* **166** (3–4), 153–164.
- Schulz A.** 2005. Role of plasmodesmata in solute loading and unloading. In: Oparka K (ed) *Plasmodesmata*. Blackwell, Oxford, 135–161.
- Schulze WX**, Reinders A, Ward J, Lalonde S, Frommer WB. 2003. Interactions between co-expressed Arabidopsis sucrose transporters in the split-ubiquitin system. *BMC Biochemistry*. **4**, 3.
- Shakya R**, Sturm A. 1998. Characterization of source- and sink-specific sucrose/H<sup>+</sup> symporters from carrot. *Plant Physiology* **118**, 1473–80.
- Shiroya T**, Lister GR, Slankis V, Krotkov G, Nelson CD. 1962. Translocation of the products of photosynthesis to roots of pine seedlings. *Canadian Journal of Botany* **40**, 1125–1135.
- Siminovitch D**, Wilson C, Briggs D. 1953. Studies on the Chemistry of the Living Bark of the Black Locust in Relation to Its Frost Hardiness. V. Seasonal Transformations and Variations in the Carbohydrates: Starch-Sucrose Interconversions. *Plant Physiology* **28**, 383–400.
- 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.
- Smith AM**, Stitt M. 2007. Coordination of carbon supply and plant growth. *Plant, Cell & Environment* **30**, 1126–1149.
- Sovonick SA**, Geiger DR, Fellows RJ. 1974. Evidence for Active Phloem Loading in the Minor Veins of Sugar Beet. *Plant Physiology* **54**, 886–891.
- Spurr A.** 1969. A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *Journal of Ultrastructure Research* **26**, 31–43.
- Srivastava A**, Ganesan S, Ismail I, Ayre B. 2008. Functional characterization of the Arabidopsis AtSUC2 Sucrose/H<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* **19**, 269–278.
- Stadler R**, Wolf K, Hilgarth C, Tanner W, Sauer N. 1995. Subcellular localization of the inducible *Chlorella* HUP1 monosaccharide-H<sup>+</sup> symporter and cloning of a co-induced galactose-H<sup>+</sup> symporter. *Plant Physiology* **107**, 33–41.
- Stitt M**, Heldt H. 1981. Physiological Rates of Starch Breakdown in Isolated Intact Spinach Chloroplasts. *Plant Physiology* **68**, 755–761.
- Stitt M**, Wirtz W, Heldt H. 1983. Regulation of Sucrose Synthesis by Cytoplasmic Fructosebisphosphatase and Sucrose Phosphate Synthase during Photosynthesis in Varying Light and Carbon Dioxide. *Plant Physiology* **72**, 767–774.

- 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** (3), 375–9.
- Tamura K**, Stecher G, Peterson D, Filipinski A, Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* **30**, 2725–2729.
- Tang C**, Huang D, Yang J, Liu S, Sakr S, Li H, Zhou Y, Qin Y. 2010. The sucrose transporter HbSUT3 plays an active role in sucrose loading to laticifer and rubber productivity in exploited trees of *Hevea brasiliensis* (para rubber tree). *Plant, Cell and Environment* **33**, 1708–1720.
- Turgeon R**, Beebe D. 1991. The Evidence for Symplastic Phloem Loading. *Plant Physiology* **96**, 349–354.
- Turgeon R**, Beebe DU, Gowan E. 1993. The intermediary cell: Minor-vein anatomy and raffinose oligosaccharide synthesis in Scrophulariaceae. *Planta* **191**, 446–456.
- Turgeon R**, Gowan E. 1990. Phloem Loading in *Coleus blumei* in the Absence of Carrier-Mediated Uptake of Export Sugar from the Apoplast. *Plant Physiology* **94**, 1244–1249.
- Turgeon R**, Hepler PK. 1989. Symplastic continuity between minor veins in *Cucurbita pepo* leaves. *Protoplasma* **83**, 217–232.
- Turgeon R**, Medville R. 1998. The absence of phloem loading in willow leaves. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America-physical Sciences* **95**, 12055–12060.
- Turgeon R**, Medville R. 2010. *Amborella trichopoda*, plasmodesmata, and the evolution of phloem loading. *Protoplasma* **248** (1), 173–80
- Turgeon R**. 1996. Phloem loading and plasmodesmata. *Trends in Plant Science* **1**, 418–423.
- Turgeon R**. 2010a. The puzzle of phloem pressure. *Plant Physiology* **154**, 578–581.
- Turgeon R**. 2010b. The role of phloem loading reconsidered. *Plant Physiology* **152**, 1817–1823.
- van Bel A**, Ammerlaan A, van Dijk A. 1994. A 3-step Screening-procedure To Identify the Mode of Phloem Loading in Intact Leaves - Evidence for Symplasmic and Apoplasmic Phloem Loading Associated with the Type of Companion Cell. *Planta* **192**, 31–39.
- van Bel A**. 1999. Evolution, polymorphology and multifunctionality of the phloem system. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* **2**, 163–184.
- van Bel A**. 2003. The phloem, a miracle of ingenuity. *Plant, Cell and Environment* **26**, 125–149.
- Vaughn MW**, Harrington GN, Bush DR. 2002. Sucrose-mediated transcriptional regulation of sucrose symporter activity in the phloem. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **99**, 10876–80.
- Voitsekhovskaja O**, Rudashevskaya E, Demchenko K, Pakhomova M, Batashev D, Gamalei Y, Lohaus G, Pawlowski K. 2009. Evidence for functional heterogeneity of sieve element-companion cell complexes in minor vein phloem of *Alonsoa meridionalis*. *Journal of Experimental Botany* **60**, 1873–1883.

**Wan T**, Liu ZM, Li LF, Leitch AR, Leitch IJ, Lohaus R, Liu ZJ, Xin HP, Gong YB, Liu Y1, Wang WC, Chen LY, Yang Y, Kelly LJ, Yang J, Huang JL, Li Z, Liu P, Zhang L, Liu HM, Wang H, Deng SH, Liu M, Li J, Ma L, Liu Y, Lei Y, Xu W, Wu LQ, Liu F, Ma Q, Yu XR, Jiang Z, Zhang GQ, Li SH, Li RQ, Zhang SZ, Wang QF, Van de Peer Y, Zhang JB, Wang XM. 2018. A genome for gnetophytes and early evolution of seed plants. *Nature Plants* **4** (2), 82–89.

**Wang XQ**, Ran JH. 2014. Evolution and biogeography of gymnosperms. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **75**, 24–40.

**Wang, T.**, Zhang, N. & Du, L. 2005. Isolation of RNA of high quality and yield from *Ginkgo biloba* leaves. *Biotechnology Letters* **27**, 629.

**Warren RL**, Keeling CI, Yuen MM, Raymond A, Taylor GA, Vandervalk BP, Mohamadi H, Paulino D, Chiu R, Jackman SD, Robertson G, Yang C, Boyle B, Hoffmann M, Weigel D, Nelson DR, Ritland C, Isabel N, Jaquish B, Yanchuk A, Bousquet J, Jones SJ, MacKay J, Birol I1, Bohlmann J. 2015. Improved white spruce (*Picea glauca*) genome assemblies and annotation of large gene families of conifer terpenoid and phenolic defense metabolism. *The Plant Journal* **83**, 189–212.

**Weber R**, Schwendener A, Schmid S, Lambert S, Wiley E, Landhäusser SM, Hartmann H, Hoch G. 2018. Living on next to nothing: tree seedlings can survive weeks with very low carbohydrate concentrations. *New Phytologist* **218**, 107–118.

**Weise A**, Barker L, Kühn C, Lalonde S, Buschmann H, Frommer W, Ward J. 2000. A new subfamily of sucrose transporters, SUT4, with low affinity/high capacity localized in enucleate sieve elements of plants. *The Plant Cell* **12**, 1345–1355.

**Wiley E**, Hoch G, Landhäusser SM. 2017. Dying piece by piece: carbohydrate dynamics in aspen (*Populus tremuloides*) seedlings under severe carbon stress. *Journal of Experimental Botany* **68**, 5221–5232.

**Willenbrink J**, Kollmann R. 1966. Über den Assimilattransport im Phloem von Metasequoia. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* **55**, 42–53.

**Willenbrink J**. 2002. Assimilate transport in phloem: regulation and mechanism. *Russian Journal of Plant Physiology* **49**, 8–15.

**Williams L**, Lemoine R, Sauer N. 2000. Sugar transporters in higher plants—a diversity of roles and complex regulation. *Trends in Plant Science* **5**, 283–290.

**Wittwer C**, Herrmann M, Moss A, Rasmussen R, others. 1997. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques* **22**, 130–139.

**Wong BL**, Baggett KL, Rye AH. 2003. Seasonal pattern of reserve and soluble carbohydrates in mature sugar maple (*Acer saccharum*). *Canadian Journal of Botany* **81**, 780–788.

**Wong M**, Medrano J. 2005. Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques* **39**, 75–85.

**Woodcock D**, Crowther P, Doherty J, Jefferson S, DeCruz E, Noyer-Weidner M, Smith S, Michael M, Graham M. 1989. Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic Acids Research* **17**, 3469–3478.

**Woodruff DR**, Meinzer FC. 2011. Water stress, shoot growth and storage of non-structural carbohydrates along the tree height gradient in a tall conifer. *Plant, Cell & Environment* **34**, 1920–1930.

- Wright D**, Scholes J, Read D, Rolfe S. 2000. Changes in carbon allocation and expression of carbon transporter genes in *Betula pendula* Roth. colonized by the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus* (Batsch) Fr. *Plant, Cell & Environment* **23**, 39–49.
- Xi Z**, Rest JS, Davis CC. 2013. Phylogenomics and coalescent analyses resolve extant seed plant relationships. *PLoS ONE* **8** (11), e80870.
- 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.
- 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. *Journal of Biological Chemistry* **285** (2), 1138–1146.
- Yang ZY**, Ran JH, Wang XQ. 2012. Three genome-based phylogeny of Cupressaceae s.l.: further evidence for the evolution of gymnosperms and Southern Hemisphere biogeography. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **64**, 452–470.
- Ziegler H.**, Mittler TE. 1959. Über den Zuckergehalt der Siebröhren bzw. Siebzellensäfte von *Heracleum Mantegazzianum* und *Picea Abies*. *Zeitschrift. Naturforschung* **14b**, 278–281.
- Zimin A**, Stevens KA, Crepeau MW, Holtz-Morris A, Koriabine M, Marçais G, Puiu D, Roberts M, Wegrzyn JL, de Jong PJ, Neale DB, Salzberg SL, Yorke JA, Langley CH. 2014. Sequencing and assembly of the 22-gb loblolly pine genome. *Genetics* **196** (3), 875–90.
- Zimmermann MH**, Ziegler H. 1975. List of sugars and sugar alcohols in sieve-tube exudates. In: Zimmermann MH, Milburn JA, eds. *Encyclopedia of Plant Physiology. Vol. 1, Transport in Plants: Phloem transport*. New York: Springer, 479–503.
- Zonneveld BJM**. 2012. The pine nut syndrome: a simple test for genome size of twelve pine nut producing trees links the bitter aftertaste to nuts of *Pinus armandii*. *Plant Systematics and Evolution* **297**, 201–206.

## Appendix

### Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
ATP	Adenosintriphosphat
AS	Aminosäure
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-indoylphosphat 4-Toluidinsalz
β-DM	β-Dodecylmaltosid
Bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin (" <i>bovine serum albumine</i> ")
°C	Grad Celsius
cDNA	kompletäre DNA
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
CH <sub>3</sub> COOK	Kaliumacetat
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
CuSO <sub>4</sub> · 5 H <sub>2</sub> O	Kupfersulfat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxigenin
DMF	N,N'-Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothritol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EST	exprimierte Sequenzteilstücke (" <i>expressed sequence tag</i> ")
<i>et al.</i>	und andere (" <i>et alii</i> ")
FG	Frischgewicht
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
gDNA	genomische DNA
GOI	Zielgen („ <i>gene of interest</i> ")
HCl	Salzsäure
HEPES	Ethansulfonsäure
HKG	Haushaltsgen (" <i>housekeeping gene</i> ")
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	destilliertes Wasser
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	Borsäure
Kap.	Kapitel
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KOH	Kaliumhydroxid
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 3 H <sub>2</sub> O	Di-Kaliumhydrogenphosphat
K <sub>3</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ]	Kaliumhexacyanoferrat(III)
m	Meter
M, mM	Molar, millimolar
mg, mL	Milligramm, Milliliter
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	Magnesiumsulfat
min	Minute
ms	Millisekunde
mV	Millivolt
mya	Vor Millionen Jahren (" <i>million years ago</i> ")
µg, µL	Mikrogramm, Mikroliter
NaCl	Natriumchlorid
NADP	Nicotinamidadeninukleotidphosphat
NaNO <sub>3</sub>	Natriumnitrat

NaOH	Natronlauge
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Natriumdihydrogenphosphat
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	Natriumhydrogenphosphat
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Natriumthiosulfat
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Natriumcarbonat
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NiCl <sub>2</sub>	Nickelchlorid
NWF	Nicht-wässrige Fraktionierung
ORF	offener Leserahmen ( <i>“open reading frame“</i> )
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H <sup>+</sup> -Ionen-Aktivität
PIPES	Piperazin-N,N'-bis(2-ethansulfonsäure)
PM	Plasmamembran
RG	Reaktionsgefäß
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>“revolutions per minute“</i> )
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
Sac	Saccharose
<i>S.cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SD	Standardabweichung ( <i>“standard deviation“</i> )
SDS	Natriumdodecylsulfat
SUC	Saccharosetransporter ( <i>“sucrose uptake carrier“</i> )
SUT	Saccharosetransporter ( <i>“sucrose uptake transporter“</i> )
Tab.	Tabelle
TM	Thylakoidmembran
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Unit (Enzymeinheit) [μmol Substrat/min]
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-β-D-galactopyranosid
ü.N.	über Nacht

## Verwendete Chemikalien

2-Propanol	Roth
5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (X-Gal)	Roth
5-Bromo-4-Chloro-3-indoylphosphat 4-Toluidinsalz (BCIP)	Roth
Acetonitril	Roth
Adenosin-5'-triphosphat (ATP) Dinatriumsalz	Roth
Agar-Agar	Roth
Agarose	Roth
Ampicillin	Roth
Bis-Tris	Roth
Calciumchlorid ( $\text{CaCl}_2$ )	Roth
Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB)	Roth
Chloroform	VWR
Citronensäure	Roth
Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs)	Bio&Sell
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Roth
Di-Kaliumhydrogenphosphat ( $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ )	Roth
Dithiothritol (DTT)	Roth
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth
Essigsäure	Roth
Ethanol	Chemsolute
Ethansulfonsäure (HEPES)	AppliChem
Ethidiumbromid	Roth
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck
Formaldehyd	Roth
Glycerol	Roth
Glycin	Roth
D(+)-Glucose	Merck
Hefeextrakt	Roth
Histoclear	Sigma
Histowax	Roth
Isoamylalkohol	Roth
Kaliumacetat ( $\text{CH}_3\text{COOK}$ )	Roth
Kaliumchlorid (KCl)	Roth
Kaliumhydroxid (KOH)	Roth
Kupfersulfat ( $\text{CuSO}_4$ )	Merck
Lithiumchlorid (LiCl)	Roth
Magnesiumchlorid ( $\text{MgCl}_2$ )	Roth
Magnesiumsulfat ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ )	Roth
$\beta$ -Mercaptoethanol	Merck
Methanol	Roth
N,N'-Dimethylformamid (DMF)	Roth
Natriumacetat	Roth
Natriumcarbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )	Roth
Natriumchlorid (NaCl)	Roth
Natriumdihydrogenphosphat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ )	Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth
Natriumnitrat ( $\text{NaNO}_3$ )	Roth
Natriumthiosulfat ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ )	Roth
Natronlauge (NaOH)	Grüssing
Nicotinamadenin dinucleotidphosphat (NADP) Dinatriumsalz	Roth
Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT)	Roth
Pepton	Roth
Phenol	Roth
Polyvinylpyrrolidon (PVP)	Fluka
Polyvinylpolypyrrolidon (PVPP)	Roth
Rinderserumalbumin (BSA)	Roth
D(+)-Saccharose	Roth
RNase AWAY	Roth

Salzsäure (HCl)	VWR
Tricin	Roth
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)	Roth
Triton X-100	Fluka
Trypton	Roth
Tween 20	Fluka
Zinksulfat (ZnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O)	Roth

## Verwendete Laborgeräte

Autoklav	H+P Labortechnik
Binokular	Zeiss
Brutschrank	Binder
Elektrophoresekammer	Biorad
Feinwaage	Ohaus Corporation
Gefriertruhe -80°C	FRYKA
Geldokumentation	INTAS UV-Systeme
Grobwaage	Ohaus Corporation
Heizblock	Biometra
HPLC	Dionex
Horizontalschüttler	VWR
Kugelmühle	Retsch
Luftbefeuchter	Honeywell
Lyphylle	Christ
Magnetrührgeräte	Phönix Instruments
Mikrotom	Leica
Mikroskop	Zeiss
Minizentrifuge	Roth
Nano-drop lite	Thermo Scientific
pH-Meter	Mettler Toledo
Photometer	Thermo Scientific
Pipetten	VWR
Rotationsverdampfer	VWR
Schüttelinkubator	Biometra
Spannungsgeber	Consort
Speed-Vac	Eppendorf
Sterilarbeitsbank	Thermo Scientific
Ultraschallstab	Bandelin
UV-Transluminator	Biometra
Vortexer	VWR
Wasserbad	VWR
Zentrifugen	
Biofuge pico	Hereaus
Centrifuge 5424	Eppendorf
Centrifuge 5804R	
Micro Star 17	VWR
Micro Star 17R	VWR
Mikro 200R	Hettich
Rotoren	
2427-A	
A-4-44	
FA-45-24-11	
qPCR-System	Agilent

## Verwendete Oligonukleotide

Spezies	Name	Sequenz	Zielgen; Verwendung; Referenz
<i>Various</i>	ST1f	GCIGCIGGIRTICARTTYGGITGGGC	SUT; <i>screening</i> ; Knop <i>et al.</i> , 2001
	ST1r	GCIACRTCIARDATCCARAAICC	
	St1lg1r	CCCATCCARTCIGTRTCRWA	SUT; <i>screening</i> ; Öner-Sieben 2014
	SUT1deg_rev	RAANGGRAACCANGCDATCCAR	SUT; <i>screening</i> ; diese Arbeit
	SUT1deg2_fwd	NGGNATHCCNCA YACNTGGGC	
	SUT3deg_fwd	NAAYAAYATGACNCARGGNCC	
	SUT3deg_rev	RAANGGRAACCANCCDATCCA	
	PCR-Anchor	GACCACGCGTATCGATGTCGAC	
	Oligo dT-Anchor	GACCACGCGTATCGATGTCGACTTTTTT TTTTTTTTTTTV	
	<i>G. gnemon</i>	GgSUT2f	CACGCCTTACATT CAGACACTTG
GgSUT2r		TGTGTCTCGCGTATATCCATCAG	
<i>G. biloba</i>	Gb_SUT1_fwd	ATGGACCGTAATCTTCGTATG	SUT; PCR; diese Arbeit
	Gb_SUT1_rev	TCAGGGAAAAGGAGAACTTTG	
	Gb_SUT2_fwd	ATGGCATCAAAGGAAGTTCGTATT	
	Gb_SUT2_rev	TCACCCAAAACCATGGCCC	
	Gb_SUT4_fwd	ATGACATTTTCTGCAGAAAG	
	Gb_SUT4_rev	CTAACTCCTGATTTGAGAAC	
	GbSUT1_NotI_f	TAAGCGGCCGCAAGCTTGTA AAAAGAA	SUT; Klonierung NEV-N; diese Arbeit
		ATGGACCGTAATCTTCGTATG	
	GbSUT1_NotI_r	TAAGCGGCCGCTCAGGGAAAAGGAGA ACTTTG	
	GbSUT2_NotI_f	TAAGCGGCCGCAAGCTTGTA AAAAGAA	
		ATGGCATCAAAGGAAGTTCGTATT	
	GbSUT2_NotI_r	TTAGCGGCCGCTCACCCAAAACCATGG CCC	
	GbSUT4_NotI_f	TAAGCGGCCGCAAGCTTGTA AAAAGAA	
		ATGACATTTTCTGCAGAAAG	
	GbSUT4_NotI_r	TAAGCGGCCGCTAACTCCTGATTTGA GAAC	
	GbSUT1q(2)fwd	TTGGGTTTCTGGATTCTTGACCT	SUT; qPCR; diese Arbeit
	GbSUT1q(2)rev	TAGCACATTTCTACTGCCATGA	
	GbSUT2q(2)fwd	TCATTCCGAGTCAGATTCAAGGC	
	GbSUT2q(2)rev	CCCTGCGGCTATCATACTAACTAA	
	GbSUT4q(1)fwd	ATCTCGCCAACAATACTCTGCAA	
GbSUT4q(1)rev	TACGAACCAGTTGCAAACCCTAA		
gapdh-hkg_gb-f	AGGAGGAATCTGAGGGGAAA	GAPDH; qPCR; Mohanta <i>et al.</i> , 2012	
<i>M. kobus</i>	gapdh-hkg_gb-r	TCACCCGAGAACTGTAACCC	
	Mk_SUT2_fwd	ATTGGTTTCTGGATGCTGGATTTG	SUT; PCR; diese Arbeit
	Mk_SUT2_rev	GTGGAGCAGAATCAGATAAACAGC	
	Mk_SUT4_fwd	CCTCATTGTCCAGCCTCTCG	
	Mk_SUT4_rev	ACTTCCCAACAATTCCCAGAGG	
	MkSUT2q_fwd	ACCAGCACGCTGTTTATCTGATT	SUT; qPCR; diese Arbeit
	MkSUT2q_rev	CCTCTTCAGCTTTCGACTCAAGAT	

---

**Fortsetzung verwendete Oligonukleotide**


---

Spezies	Name	Sequenz	Zielgen; Verwendung; Referenz
<i>M. kobus</i>	MkSUT4q_fwd	TCCTTCTGGTCATCACTACGTTT	SUT; qPCR; diese Arbeit
	MkSUT4q_rev	CCTGAAACTTCCCAACAATTCC	
	HKG_actinF	ACCGAAGCCCCTCTTAACCC	
<i>P. abies</i>	HKG_actinR	GTATGGCTGACACCATCACC	SUT; PCR; diese Arbeit
	Pa_SUT1_fwd	ATGAATACAGATCTTCGTACCG	
	Pa_SUT1_rev	TCAGGGAACAGGAGAACTTCTT	
	Pa_SUT2_fwd	ATGGCGCCCAAGGAAATTCGTA	SUT; Klonierung NEV- N; diese Arbeit
	Pa_SUT2_rev	TCATCCAAAACCGTGGCCC	
	PaSUT1_NotI_f	TAAGCGGCCGCAAGCTTGTA AAAAGAA ATGAATACAGATCTTCGTACCGGTAGG AG	
	PaSUT1_NotI_r	TAAGCGGCCGCTCAGGGAACAGGAGA ACTTCTT	
	PaSUT2_NotI_f	TAAGCGGCCGCAAGCTTGTA AAAAGAA ATGGCGCCCAAGGAAATTCGTA	
	PaSUT2_NotI_r	TAAGCGGCCGCTCATCCAAAACCGTGG CCC	
	PaSUT1q(2)fwd	AACA ACTGCACTCACTTGGATTG	
	PaSUT1q(2)rev	AGTGATCCTGCTCTAACACCTTG	
PaSUT2qfwd	GATGGGACGGGAAGTATATCAGG		
PaSUT2qrev	GCTGACTCCAAGCACAAATAGAG		

---

## Puffer und Lösungen für die *in-situ*-Hybridisierung

Puffer/Lösung	Substanz	Konzentration	Anmerkung
Fixierlösung	Paraformaldehyd in 1x PBS-Puffer pH 7,0 (mit NaOH)	4 % (w/v)	pH einstellen vor Zugabe
Carbonat-Puffer	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> pH 11,4	0,2 M	beide Lösungen 1:1 mischen
	NaHCO <sub>3</sub> pH 8,2	0,2 M	
10x PBS-Puffer	NaCl	1,3 M	ü.N. inkubieren
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	70 mM	
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	30 mM	
	pH 7,0 (mit HCl) DEPC	0,1 % (v/v)	
Essigsäure-Anhydrid-Lösung	Triethanolamin pH 8,0 (mit HCl)	0,1 M	frisch ansetzen
	Essigsäure-Anhydrid	0,6 % (v/v)	vor Benutzung zufügen
Hybridisierungspuffer	NaCl	3 M	Lösen bei 60 °C
	Tris (pH 8)	0,1 M	
	NaPO (pH 6,8)	0,1 M	
	EDTA	50 mM	
	deionisiertes Formamid	50 % (v/v)	
	Dextransulfat (50 % (w/v))	2,5 % (v/v)	
	Denhardts-Lösung (50x)	2,5 % (v/v)	
20x SSC-Puffer	tRNA	100 mg/mL	ü.N. inkubieren
	NaCl	3 M	
	Na-Citrat pH 7,0 (mit HCl)	0,3 M	
	DEPC	0,1 % (v/v)	
5x NTE-Puffer	NaCl	2,5 M	
	Tris	1 M	
	EDTA	5 mM	
	pH 8,0 (mit HCl)		
Puffer 1	NaCl	150 mM	
	Tris	100 mM	
Puffer 2	Blockreagenz In Puffer 1	0,5 % (w/v)	frisch ansetzen
Puffer 3	BSA	1 % (w/v)	
	Triton-X-100 In Puffer 1	0,3 % (v/v)	
Puffer 4	Anti-DIG-Antikörper In Puffer 3	1:1250	
Färbelösung	MgCl <sub>2</sub>	50 mM	
	NaCl	100 mM	
	Tris	100 mM	
	NBT	75 mg/mL	
	BCIP	50 mg/mL	
	Levamisol	24 mg/mL	
	pH 9,5 (mit HCl)		

## Sequenzen der EST zusätzlich identifizierter SUT

Informationen über die kompletten SUT-Sequenzen (ORF) können über die in dieser Arbeit angegebenen Zugriffsnummern über NCBI abgerufen werden (Tabelle 3.4).

Name	Sequenz
<i>Magnolia kobus</i> <i>MkSUT2</i> 980 Bp	GCGGCGGGGTGCARTTTGGGTGGGCCCTGCAGCTCTCGCTTCTGACGCCCTATGTTTCAGAC ACTTGGAAATAGCGCATGCGTTTTCTTCATTCATCTGGCTTTGTGGCCCCATTACAGGTCTTG TGGTTCAACCATGTGTTGGTATTTGGAGTGATAAATGCTACTCAAAATATGGAAGAAGACGG CCATTTATTTTAGTTGGATCCCTCATGATCTCTATCGCTGTGACAATAATCGGGTTTGCTGC AGACGTTGGATACTATCTAGGGGACACAAAGGAGCATTGCAGTACATATAAAGGTACTCGAG TGGGGCAGCTATTGTTTTTATCATTTGGTTTCTGGATGCTGGATTTGGCTAACAAATACAGTG CAAGGTCCAGCTCGCGCTCTTCTGGCTGATCTCTCAGGGCCTGACCAAAAAATGCAGCAAA TGCGATATTTTGCTCATGGATGGCTATTGGAAACATTGTAGGGTATTCTTCTGGTGCTAGTG GAAGTTGGCACAGGTGGTTTCCATTTTGAACAACAGAGCTTGTGTGAAGCCTGTGGAAAT TTGAAAGCAGCCTTTCTTGTAGCTGTGGTCTTCCCTCACATTTCTGCACAGCTGTGACTCTGTA TTTTGCTAAGGAGATCCCCTAGTTAAACCAGCAGCCTGTTTATCTGATTTCTGCTCCACTGT TGAATGATACACCACAACCTGGTTTTGGAGACACAAATCCTGAGAAGCCAGTTGATGATCAA GCATCTGGAATCAGTACAGTTGCTGGGAAAATATTTCTGAAAATTCAATTCATCTTGAGTC GAAAGCTGAAGAGGACCAAAATGAAGCCTTTTCTGATAGTCTGGAGCAGTCTTGGTAAATA TTTTGACAAGCATGAGGCATTTACCACCCGCCATGCATTCAGTGCTACTTGTCTATGGCTCTT AGTTGGTTGTCATGGTTTCCATTTATTTCTCTWCGACACCGACTGGATGGG
<i>MkSUT4</i> 750 Bp	GGGGATTCCGCATACGTGGGCCAGCCTCGTCTGGCTTTGTGGCCCGCTTTCGGCCTCATTG TCCAGCCTCTCGTCGGCCACATGAGCGGCCGCTGCTCGAGCCGATACGGCCCGCAGGCCG TTCATTGCGGCTGGCGCTGTGGCGATAGTCGTCGCGGTGCTGATCATCGGATACTCAGCCGA CATCGGGCGGTTGCTGGGCGACGGCGTGCGGCGTCCGCGGGCCATCGTCGCCCTTCGTCATCG GGTTTTGGCTGCTCGATGTGCGGAATAACGTGATGCAGGGGCCCTTGTGCGGCCCTACTCGCA GATCTCACCGGAAGGATCATCGAAGGACTCGCATAGCAAATGCATATTTTTCACTTTTCAT GGCTCTGGGTAACATCCTTGGCTTTGCAACCGGGTCTACAGTGGTTGGCATGCCATATTCC CCTTACCACCCTCCTTGCAGTATTAACATGTGCCAATCTCAAGTCTGCCTTCCCTCTC GATATTGCTCTTCTGGTTCATCCTACGTTTGTAAAGCATCTCGGCAGTCCAAGAACAGCCTCT AAATACTCACAAACACACCTGAATGCTCAGAAGAACCGCAACTGCAGTTGGATCACAGCCAAG AAGCTTTCCTCTGGGAATTGTTGGGAAAGTTTTCAGGTACCTCTCAGTGCCAATCTGGATAGTT CTCATCGTTACCGCATTGACATGGATTGGATGGTTCCATTTCTTCTACGACACCGACTG GATGGG
<i>Gnetum gnemon</i> <i>GgSUT2</i> 980 Bp	GCGGCGGGGATGCAGTTTGGGTGGGCGCTTCAGCTTTCTCTTCTCACGCCCTTACATTCAGAC ACTTGGAAATCGGACATGCATTTTCATCTTTTCACTTTGGCTTTGTGGCCCCGATAACAGGACTTG TGGTTCAACCTGTTGTTGGTATATGGAGTGACAAGTGCCATTTCAAATATGGACGAAGGCGT CCTTTTATTCTTATTGGGTCTGCCATGATTTCTTTGGCAGTAACCATTATAGGATTTTCTGC AGATGTCGGTTACATTTCTGGTGACACGAAACAGCATTGCAGTAAATATCGTGGATCACGAC CAAGAGCCGCGCTTGTGTTTGTGTTGGATTTTGGATGCTTGACTTGGCTAACAAATACAGTA CAAGGACCAGCACGGGCTTTACTAGCTGATATTTTCAGGTCTGATCAAAAAGGTTTCAGCAAA TGCAATTTTTTGTTCATGGATGGCACTTGGTAACATCCTGGGATTTCTGCTGGTGCCAGTG GGCAGTGGCACAGGTGGTTCCCATTCCTTACTACTAGAGCTTGTGTGAAGCATGTGGAAAT TTGAAAGGAGCTTTTATGGTTGCAGTGGTCTTTCTTTTGATTTGCGCAGCTATTACAATCTG CTTCGCAAATGAGATTCCTACTAGAGTCAAAAAGTACTGGACAGTACGCTGACTCAGATCCTT TGCTACATGGTTCGAGAGAACAGACCAAAAGGAAATAAGAAAAGAAGTTGGCACATCAGAGGGA AGTTTTGCTGATGGATATACCGGAGACACATCTCTATCGAATGGAAATTCAAAGTTTCATTC CGAAAACACAGAAGTAAAGAAAACATGCATACAATGATGGGCCCTGGTGTGTTAGTCAATC TCTTGACTGGCATGAGGCATTTCTCCAGCAATGAAAGCGGTTCTTTTGGTTTTCAGCACTT ACTTGGTTGGCCTGGTTTCCATTTCTTCTGTTTCGACACCGACTGGATGGG

## Liste der für die phylogenetischen Analysen verwendeten Saccharose-Transporter

Spezies	Familie	Transporter	Typ	Zugriffsnummer*
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Brassicaceae	AtSUC1	I	AEE35247
		AtSUC2	I	AEC05635
		AtSUT2	II	CAB92307
		AtSUT4	III	AAL59915
<i>Fagus sylvatica</i>	Fagaceae	FsSUT1	I	MH650992
<i>Fraxinus excelsior</i>	Oleaceae	FeSUT1	I	AHB33870
<i>Ginkgo biloba</i>	Ginkgoaceae	GbSUT1	I	MH650993
		GbSUT2	II	MH650994
		GbSUT4	III	MH650995
<i>Gnetum gnemon</i>	Gnetaceae	GgSUT2	II	-
<i>Hevea brasiliensis</i>	Euphorbiaceae	HbSUT3	I	ABK60190
		HbSUT4	III	ABK60191
<i>Juglans regia</i>	Juglandaceae	JrSUT1	I	AAU11810
<i>Magnolia kobus</i>	Magnoliaceae	MkSUT2	II	-
		MkSUT4	III	-
<i>Oryza sativa</i>	Poaceae	OsSUT1	IIB	BAA24071
<i>Physcomitrella patens</i>	Funariaceae	PpSUT2A	II	18051919 <sup>#</sup>
		PpSUT2B	II	18064412 <sup>#</sup>
		PpSUT4A	III	18040351 <sup>#</sup>
		PpSUT4B	III	18037160 <sup>#</sup>
		PpSUT4C	III	18053343 <sup>#</sup>
<i>Picea abies</i>	Pinaceae	PaSUT1	I	MH281472
		PaSUT2	II	MH281473
<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>Ricinus communis</i>	Euphorbiaceae	RcSUT1	I	CAA12256
		RcSUT4	III	AAU21439
<i>Selaginella moellendorffii</i>	Selaginellaceae	SmSUT2	II	15412113 <sup>#</sup>
		SmSUT4A	III	15419655 <sup>#</sup>
		SmSUT4B	III	15407332 <sup>#</sup>
		SmSUT4C	III	15417411 <sup>#</sup>
		SmSUT4D	III	15402611 <sup>#</sup>
<i>Zea mays</i>	Poaceae	ZmSUT1	IIB	NP_001292720.1

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

<sup>#</sup> Zugriffsnummer für die Datenbank <https://phytozome.jgi.doe.gov/>

## Danksagungen

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof'in Dr. Gertrud Lohaus für die Möglichkeit in ihrer Arbeitsgruppe an diesem interessanten und anspruchsvollen Thema zu arbeiten und die sehr gute wissenschaftliche und persönliche Unterstützung während dieser Zeit.

Bei Frau Prof'in Dr. Gela Preisfeld bedanke ich mich für die Übernahme des Co-Referats.

Dem botanischen Garten der Ruhr-Universität Bochum danke ich für die Bereitstellung der *Gnetum gnemon* Pflanzen.

Bei Prof. Dr. Andreas Barbian und Dr. Franz Klebl möchte ich mich für die Erstellung der TEM-Aufnahmen bzw. für die heterologe Expressionsmessungen in der Hefe bedanken.

Ein großer Dank geht an die Mitglieder der Arbeitsgruppe Botanik. An Elena und Laura für die Unterstützung im Labor und die Diskussionen in unserer „Baumfraktion“. An Thomas und Basel für die Hilfe mit diversen technischen Geräten und Anwendungen und Basel noch besonders für unseren „Fußball-Talk“. An Antje und Rosi für die netten Gespräche im Büro nebenan und Rosi darüber hinaus für die Korrekturen unserer Paper. An Tim für seine Hilfe mit den Proben für die NWF und die HPLC, sowie den teils philosophisch anmutenden Gesprächen. Ganz herzlich möchte ich mich bei Kira für die Hilfe beim „Ankommen“ in Wuppertal bedanken.

Ihr Alle habt für eine wunderbare Arbeitsatmosphäre gesorgt und dafür, dass ich immer gerne zur Arbeit gekommen bin auch wenn es mal so gar nicht lief.

Den Mitgliedern der beiden Arbeitsgruppen Zoologie und Mikrobiologie danke ich für ihre stete Hilfsbereitschaft und das ich die Labore nutzen durfte.

Ich möchte mich auch bei Antje, Elena, Laura und Soner für das Korrekturlesen großer Teile dieser Arbeit und ihre kritischen Kommentare bedanken.

Von ganzem Herzen danke ich meiner besseren Hälfte Corinna. Danke für dein Vertrauen, dein Verständnis und ganz besonders deine immerwährende Unterstützung, nicht nur in der Endphase dieser Arbeit.

## 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.

---

Daniel Fink

(Wuppertal, im Juli 2019)