

RP

TU

Rheinland-Pfälzische
Technische Universität
Kaiserslautern
Landau

***Chilling* Lektionen:**

So lernen Zuckerrüben, mit der Kälte umzugehen

vom Fachbereich Biologie

der Rheinland-Pfälzischen Technischen Universität Kaiserslautern-Landau

zur Verleihung des akademischen Grades Dr. rer. nat. genehmigte

Dissertation

vorgelegt von

Cristina Schmale Rodrigues, M.Sc.

Wissenschaftliche Aussprache:

Berichterstattende:

21.08.2025

Prof. Dr. H. Ekkehard Neuhaus

Prof. Dr. Matthias Hahn

Kaiserslautern im Jahr 2025

D 386

Inhaltsverzeichnis

1	<u>EINLEITUNG</u>	1
1.1	DIE KOHLENHYDRATVERTEILUNG INNERHALB DER PFLANZE IST KOMPLEX ORGANISIERT.	1
1.1.2	REGULATION DES LANGSTRECKENTRANSPORTS	3
1.2	ABIOTISCHER STRESS BEEINFLUSST DIE KOHLENHYDRATVERTEILUNG	3
1.2.1	CHILLING ALS VORBEREITUNG ZUR STRESSTOLERANZ	4
1.2.2	VAKUOLÄRER TRANSPORTER REGULIEREN DIE INTRAZELLULÄRE ZUCKERVERTEILUNG.....	5
1.3	CHILLING ALS VORBEREITUNG DER FORTPFLANZUNG VON ZUCKERRÜBEN	6
1.4	ZIELSETZUNG DIESER ARBEIT	7
2	<u>MATERIAL UND METHODEN</u>	9
2.1	PFLANZENMATERIAL	9
2.2	PFLANZENANZUCHT UND ERNTE	10
2.3	BESTIMMUNG DES WASSERGEHALTES	11
2.4	PFLANZENPHYSIOLOGISCHE METHODEN	11
2.4.1	ELEKTROKONDUKTIVITÄT	11
2.4.2	PULSAMPLITUDENMODULATIONS (PAM)-FLUOROMETRIE	13
2.4.3	ASSAY ZUR TRANSLOKATION VON RADIOAKTIV MARKIERTER SACCHAROSE.....	14
2.4.4	GASAUSTAUSCH-MESSUNGEN	15
2.4.5	ATMUNG VON ZUCKERRÜBEN-PFAHLWURZELGEWEBE.....	15
2.4.6	ISOLIERUNG VON PFAHLWURZELVAKUOLEN UND VAKUOLÄREN PROTEINEN.....	15
2.5	FUNKTIONELLE ANALYSEN.....	16
2.5.1	EXTRAKTION LÖSLICHER PROTEINE	16
2.5.2	AUFNAHMESTUDIEN AN <i>XENOPUS LAEVIS</i> OOZYTEN	17
2.5.2.1	cRNA-SYNTHESE	17
2.5.2.2	HERSTELLUNG DER INJEKTIONSNADELN	18
2.5.2.3	MIKROINJEKTION VON <i>XAENOPUS LAEVIS</i> OOZYTEN	19
2.5.3	SPS-ASSAY	19
2.6	MIKROSKOPIE	20
2.6.1	SUBZELLULÄRE LOKALISIERUNG VON BVSUT4 UND BVIMP2 IN VERSCHIEDENEN PFLANZENSYSTEMEN 20	
2.6.2	IN PLANTA ESCULIN-TRANSPORT	21
2.7	METABOLITEXTRAKTION UND -QUANTIFIZIERUNG.....	21
2.7.1	EXTRAKTION LÖSLICHER METABOLITE AUS PFLANZENGEWEBE.....	21
2.7.1.1	EXTRAKTION UND VERDAU VON STÄRKE.....	22
2.7.1.2	ENZYMATISCHE ZUCKER- UND STÄRKEQUANTIFIZIERUNG	22
2.7.2	IONENCHROMATOGRAPHISCHE (IC) MESSUNGEN	23
2.7.3	ANALYSE DER PHOSPHORYLIERTER METABOLITE	23
2.8	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	23
2.8.1	ISOLATION VON RNA ZUR EXPRESSIONSANALYSE MITTELS RNA-SEQUENZIERUNG (RNASeq).....	23

2.8.1.1	RNA-EXTRAKTION UND REINIGUNG	23
2.8.1.2	CDNA-SYNTHESE UND RNA SEQUENZIERUNG	24
2.8.1.3	DATENANALYSE.....	24
2.8.2	ISOLATION VON RNA ZUR EXPRESSIONSANALYSE MITTELS QUANTITATIVER REAL TIME PCR (QPCR)24	
2.8.2.1	CDNA-SYNTHESE	24
2.8.2.2	EXPRESSIONSANALYSEN MITTELS QPCR.....	25
2.8.2.3	OLIGONUKLEOTIDE (PRIMER)	25
2.9	COMPUTERGESTÜTZTE ANALYSEN	26
2.9.1	PHYLOGENETISCHE ANALYSEN	26
2.9.2	ABBILDUNGEN	26
2.9.3	STATISTIK	27
2.9.4	GEN-IDENTIFIKATOREN	27
2.10	KOOPERATIONEN UND UNTERSTÜTZUNG.....	28
3	ERGEBNISSE	29
3.1	ANALYSE DES WECHSELS DER <i>SOURCE-SINK</i>-IDENTITÄT BEI ZUCKERRÜBEN HINSICHTLICH DER REGULATION DES BLÜHVERHALTENS UND DER FROSTTOLERANZ.....	29
3.1.1	KÄLTEEXPOSITION VERURSACHT EINE RAPIDEN ABNAHME DES SPROSS- UND WURZEL- WASSERGEHALTS, ABER NICHT DER SPROSS-BIOMASSEPRODUKTION.....	29
3.1.2	DER ZUCKERSPIEGEL REAGIERT IM SPROSS UND DER PFAHLWURZEL UNTERSCHIEDLICH AUF KÄLTE .	30
3.1.3	KÄLTEEXPOSITION BEEINFLUSST DIE PHOTOSYNTHESE-RATE UND DIE CO ₂ -ASSIMILATION	32
3.1.4	KALTE TEMPERATUREN VERÄNDERN DEN HAUPTKOHLENHYDRATSTOFFWECHSEL IN SPROSS UND PFAHLWURZEL	35
3.1.5	KALTE TEMPERATUREN BEWIRKEN EINE UMKEHRUNG DER PHLOEM-TRANSLOKATION VON SACCHAROSE UND SEINEM FLUORESZIERENDEN ANALOG ESCULIN	39
3.1.6	VAKUOLÄRE SACCHAROSE-IMPORTER UND -EXPORTER-GENE SOWIE -PROTEINE ZEIGEN KÄLTEABHÄNGIG ENTGEGENGESETZTE EXPRESSION	42
3.1.7	DIE EXPRESSION VON BLÜTENREGULATOR-GENEN IST KÄLTEREGLIERT.....	44
3.1.8	KÄLTE INDUZIERT EINE <i>SINK</i> - ZU <i>SOURCE</i> -TRANSITION	46
3.2	GEZIELTE MODULIERUNG DER INTRAZELLULÄREN ZUCKERKOMPARTIMENTIERUNG ZUR OPTIMIERUNG DER FROSTTOLERANZ SOWIE DES BLÜHVERHALTENS VON ZUCKERRÜBE UND ARABIDOPSIS	47
3.2.1	EINE EXPRESSION DES ZUCKER-TRANSPORTER-GENS <i>BvSUT4</i> UNTERDRÜCKT INFOLGE ERHÖHTER VAKUOLÄRER ZUCKERFREISETZUNG DIE KÄLTEAKKLIMATISIERUNGS-EFFEKTE UND FÖRDT DAS BLÜHVERHALTEN IN ARABIDOPSIS	47
3.2.1.1	DIE EXPRESSION DES VAKUOLÄREN ZUCKER-EXPORTER-GENS <i>BvSUT4</i> IST ZUCKER- REPRIMIERT UND KÄLTEINDUZIERT	48
3.2.1.2	EINE ERHÖHUNG DES VAKUOLÄREN SACCHAROSE-AUSSCHLUSSES VERURSACHT EINEN RAPIDEN KÄLTEBEDINGEN VERLUST DES ROSETTEN-WASSERGEHALTS EINSCHLIEßLICH EINER ERNIEDRIGTEN BIOMASSEPRODUKTION IN ARABIDOPSIS	49
3.2.1.3	DIE <i>BvSUT4</i> -EXPRESSIONSTÄRKE REGULIERT EINE KÄLTEVERSTÄRKTE VERSCHIEBUNG DES MONO- ZU DISACCHARID-VERHÄLTNISSES UND BEEINFLUSST DIE DIURNALE STÄRKE- RHYTHMIK.....	50
3.2.1.4	EIN VERMINDERTER VAKUOLÄRER SACCHAROSE-GEHALT HEBT DEN VORTEILHAFTEN EFFEKT EINER KÄLTEAKKLIMATISIERUNG AUF	52
3.2.1.5	DIE EXPRESSION ZUCKER-SENSITIVER GENE WIRD DURCH DIE ABUNDANZ DES VAKUOLÄREN ZUCKER-EXPORTERS <i>BvSUT4</i> REGULIERT	53

3.2.1.6	EIN VERMINDERTER VAKUOLÄRER SACCHAROSE-GEHALT IST VORTEILHAFT FÜR DAS BLÜHVERHALTEN UND DAS SAMENGEWICHT	54
3.2.1.7	<i>BvSUT4</i> -EXPRESSOREN ZEIGEN UNABHÄNGIG VON DER UMGEBUNGSTEMPERATUR ERHÖHTE NITRAT- UND REDUZIERT NATRIUM-GEHALTE	55
3.2.1.8	DER CITRAT-ZYKLUS IST ABHÄNGIG VON DER SUBZELLULÄREN ZUCKERVERTEILUNG.....	56
3.2.2	EINE EXPRESSION DES ZUCKER-TRANSPORTER-GENS <i>BvIMP2</i> AKTIVIERT INFOLGE ERHÖHTER VAKUOLÄRER ZUCKERSPEICHERUNG DEN LANGSTRECKENTRANSPORT	58
3.2.2.1	IDENTIFIZIERUNG EINES ZUCKER-BELADERS AUS ZUCKERRÜBE-VAKUOLEN.....	58
3.2.2.2	DIE EXPRESSION DES VAKUOLÄREN ZUCKER-IMPORTER-GENS <i>BvIMP2</i> IST ZUCKER-REPRIMIERT UND KÄLTEINDUZIERT	59
3.2.2.3	EINE ERHÖHUNG DER VAKUOLÄREN ZUCKER VERURSACHT EINEN RAPIDEREN KÄLTEBEDINGEN VERLUST DES ROSETTEN-WASSERGEHALTS TROTZ EINER LEICHT ERHÖHTEN BIOMASSEPRODUKTION	61
3.2.2.4	DIE <i>BvIMP2</i> -EXPRESSIONSTÄRKE REGULIERT EINE KÄLTEVERSTÄRKTE VERSCHIEBUNG DES MONO- ZU DISACCHARID-VERHÄLTNISSES.....	61
3.2.2.5	EIN ERHÖHTER <i>BvIMP2</i> -GEHALT VERRINGERT DEN VORTEILHAFTEN EFFEKT EINER KÄLTEAKKLIMATISIERUNG AUF DIE FROSTTOLERANZ	63
3.2.2.6	DIE EXPRESSION ZUCKER-SENSITIVER GENE WIRD DURCH DIE ABUNDANZ DES VAKUOLÄREN ZUCKER-EXPORTERS <i>BvIMP2</i> REGULIERT	63
3.2.2.7	<i>BvIMP2</i> IST AN DER REGULIERUNG DES LANGSTRECKENTRANSPORTS BETEILIGT	64
3.2.2.8	DIE <i>BvIMP2</i> -EXPRESSION IST IN ASSIMILIERENDEN BLÄTTERN ERHÖHT UND KONSUMIERENDEN BLÄTTERN REDUZIERT	65
3.2.2.9	EIN ERHÖHTER VAKUOLÄRER ZUCKER-GEHALT IST TROTZ VERZÖGERTEN SCHOSSENS VORTEILHAFT FÜR DIE INFLORESZENZLÄNGE	67
3.2.2.10	<i>BvIMP2</i> -EXPRESSOREN ZEIGEN REDUZIERT IONEN-GEHALTE, WÄHREND DER NITRAT-GEHALT UNTER KÄLTEBEDINGUNGEN ANSTEIGT	68
3.2.2.11	DER CITRAT-ZYKLUS IST ABHÄNGIG VON DER SUBZELLULÄREN ZUCKERVERTEILUNG	69
3.2.3	UNTERSUCHUNG DER KÄLTEINDUZIERTEN ÄNDERUNG DES MONO- ZU DISACCHARID-VERHÄLTNISSES DURCH EXPRESSION VON <i>AtTST1</i> IN ZUCKERRÜBEN-PFAHLWURZELN.....	70
3.2.3.2	EIN ERHÖHTER VAKUOLÄRER ZUCKER-GEHALT UNTERSTÜTZT IN PFAHLWURZELN DEN VORTEILHAFTEN EFFEKT EINER KÄLTEAKKLIMATISIERUNG AUF DIE FROSTTOLERANZ.....	72
3.2.4	ANALYSE EINER PFAHLWURZELSPEZIFISCHEN <i>BvTST2;1</i> -EXPRESSION IN <i>BETA VULGARIS</i>	73
3.2.4.2	DIE <i>BvTST2;1</i> -EXPRESSION REGULIERT EINE KÄLTEVERSTÄRKTE VERSCHIEBUNG DES MONO- ZU DISACCHARID-VERHÄLTNISSES.....	75
4	DISKUSSION	79
4.1	VERNALISATION BEEINFLUSST DIE <i>SINK</i>- UND <i>SOURCE</i>-IDENTITÄT UND BEWIRKT EINE UMKEHR DES PHLOEMTRANSPORTSTROMS VON PFAHLWURZELN IN RICHTUNG DES SPROSSES	79
4.1.2	ERHALTUNG VON ZUCKERRESERVEN TROTZ REDUZIERTER PHOTOSYNTHESELEISTUNG IN KÄLTEEXPONIERTE ZUCKERRÜBEN	81
4.1.3	KÄLTEINDUZIERT REMOBILISIERUNG VON ZUCKER AUS PFAHLWURZELSPEICHERN UND DIE ROLLE VON SACCHAROSE-TRANSPORTERN	82
4.1.4	KÄLTEINDUZIERT PROZESSE ALS VORBEREITUNG AUF DAS BLÜHEN IN ZUCKERRÜBEN: DIE VERBINDUNG ZWISCHEN ZUCKERSTOFFWECHSEL UND BLÜTENREGULATORGENEN.....	83
4.2	DIE ROLLE VON <i>SUT4</i> IN DER KÄLTEANPASSUNG VON ZUCKERRÜBEN	83
4.2.1	MECHANISMEN DER SUBZELLULÄREN ZUCKERVERLAGERUNG UND DIE AUSWIRKUNGEN AUF DIE MEMBRANINTEGRITÄT BEI KÄLTE	84

4.2.2	ROLLE VON BvSUT4 IM LANGSTRECKENTRANSPORT UND IN DER BLÜTENENTWICKLUNG.....	85
4.3	BVIMP2 ALS EIN ZENTRALER REGULATOR DER ZUCKERHOMÖOSTASE IN ZUCKERRÜBEN	87
4.3.1	SUBZELLULÄRE EFFEKTE EINER BVIMP2-EXPRESSION AUF DIE SUBZELLULÄRE ZUCKER-ALLOKATION ALS TEIL DER KÄLTEANTWORT.....	87
4.3.2	BVIMP2 ALS SUBZELLULÄRER FEINREGULATOR ZUR STEUERUNG DER LANGSTRECKENTRANSPORT- INTENSITÄT	88
4.3.3	DIE GLOBALE ROLLE VON BVIMP2 IN ZUCKERRÜBEN: EINFLUSS AUF ZUCKER-SENSITIVE PROZESSE UND DEN LANGSTRECKENTRANSPORT	89
4.4	EINFLUSS EINER ATTST1-EXPRESSION AUF DIE KÄLTEANPASSUNG UND ZUCKERAKKUMULATION VON ZUCKERRÜBEN BEI ENTKOPPELTER BETRACHTUNG DER SOURCE- UND SINK-FUNKTIONEN	90
4.5	EINBLICKE IN DIE ROLLE DES PITHGEWEBES BEI DER ZUCKERHOMÖOSTASE VON ZUCKERRÜBEN	93
4.6	SCHWELLENWERT-EFFEKTE DER BvTST2;1-EXPRESSION ALS VORAUSSETZUNG FÜR DIE EFFIZIENTE KANALISIERUNG VON ZUCKER IN DIE WURZELVAKUOLE	94
4.7	CHILLING LEKTIONEN: SO LERNEN ZUCKERRÜBEN, MIT DER KÄLTE UMZUGEHEN	95
4.7.1	LEKTION N° 1 – ZUCKERAKKUMULATION ALS SCHUTZSTRATEGIE	95
4.7.2	LEKTION N° 2 – BALANCE ZWISCHEN SOURCE UND SINK	96
4.7.3	LEKTION N° 3 – REPRODUKTIONSSTRATEGIEN UNTER STRESS.....	96
4.7.4	LEKTION N° 4 – GROßE ANPASSUNGEN BEGINNEN IM KLEINEN	97
4.8	AUSBLICK	98
5	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	100
6	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	101
7	<u>ANHANG</u>	114
7.1	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	114
7.2	TABELLENVERZEICHNIS	116
7.3	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	117
7.4	ERGÄNZENDE ABBILDUNGEN	121

1 Einleitung

Pflanzen verfügen über eine bemerkenswerte Fähigkeit zur Energieumsetzung, welche mit dem Einfangen (engl. *harvesting*) von Photonen beginnt, die in photosynthetisch aktiven Geweben (*Source*-Organe) zur Assimilation von CO₂ dienen. Der so fixierte Kohlenstoff wird anschließend zu einer Vielzahl weiterer Pflanzengewebe (*Sink*-Organe) transportiert, um auch deren Wachstum und Entwicklung zu fördern. Gefäßpflanzen akkumulieren den gebundenen Kohlenstoff in Speichergeweben wie Samen oder Speicherwurzeln, um somit über Energie wie auch Baustoffe für deren künftiges Wachstum zu verfügen. Da die in diesen Organen gespeicherten Kohlenhydrate auch eine wichtige Quelle für die menschliche wie tierische Ernährung darstellen, ist das Verständnis der molekularen und physiologischen Mechanismen in *Source*- und *Sink*-Geweben essentiell, auch im Hinblick auf eine gerichtete Züchtung von Kulturpflanzen.

1.1 Die Kohlenhydratverteilung innerhalb der Pflanze ist komplex organisiert

Die Wurzel, welche wie die Samen in der Phase der Biomassenzunahme ein *Sink* darstellt, ist mit den Blättern (*Source*) über das sogenannte Phloem (altgr. Bast/Rinde) verbunden. Das Phloem besteht grundsätzlich aus zwei Zelltypen, den Geleit- und Siebzellen. In den Siebzellen wird der assimilierte Kohlenstoff hauptsächlich in Form von Saccharose (Julius *et al.*, 2017) über einen Massenstrom von *Source* nach *Sink* transportiert wird (Babst *et al.*, 2022; Münch, 1930). Neben Saccharose beinhaltet das Phloem mancher Pflanzen (z.B. der Mitglieder der Rosaceae Familie) aber auch signifikante Gehalte von Zuckeralkoholen, während alle 20 biogenen Aminosäuren neben jedweder Form von Kohlenhydraten auch stets im Phloem anzutreffen sind (Afoufa-Bastien *et al.*, 2010; Ruiz-Medrano *et al.*, 2001; Tegeder und Hammes, 2018). Die Beladung des Phloems mit Saccharose erfolgt in den meisten Pflanzen in einem apoplastischen Prozess, bei dem der Zucker zunächst über die **SUGAR WILL EVENTUALLY BE EXPORTED TRANSPORTER** Proteine (hier insb. SWEET11 und 12) die Mesophyllzellen bzw. die Phloem-Parenchymzellen verlässt (Chen *et al.*, 2012) um dann energieaufwändig, d.h. im Protonensymport, in die Geleitzellen aufgenommen zu werden. Der dadurch ausgelöste Wassereinstrom führt zur Druckerhöhung, die den o.g. Massenstrom in Richtung der *Sink*-Organe bewirkt. Auch bei der Zuckerrübe (*Beta vulgaris*) handelt es sich um einen apoplastischen „Belader“, wobei dieser Prozess in der Realität eine Vielzahl von Transportern und Enzymen bedarf (Abbildung 1.1).

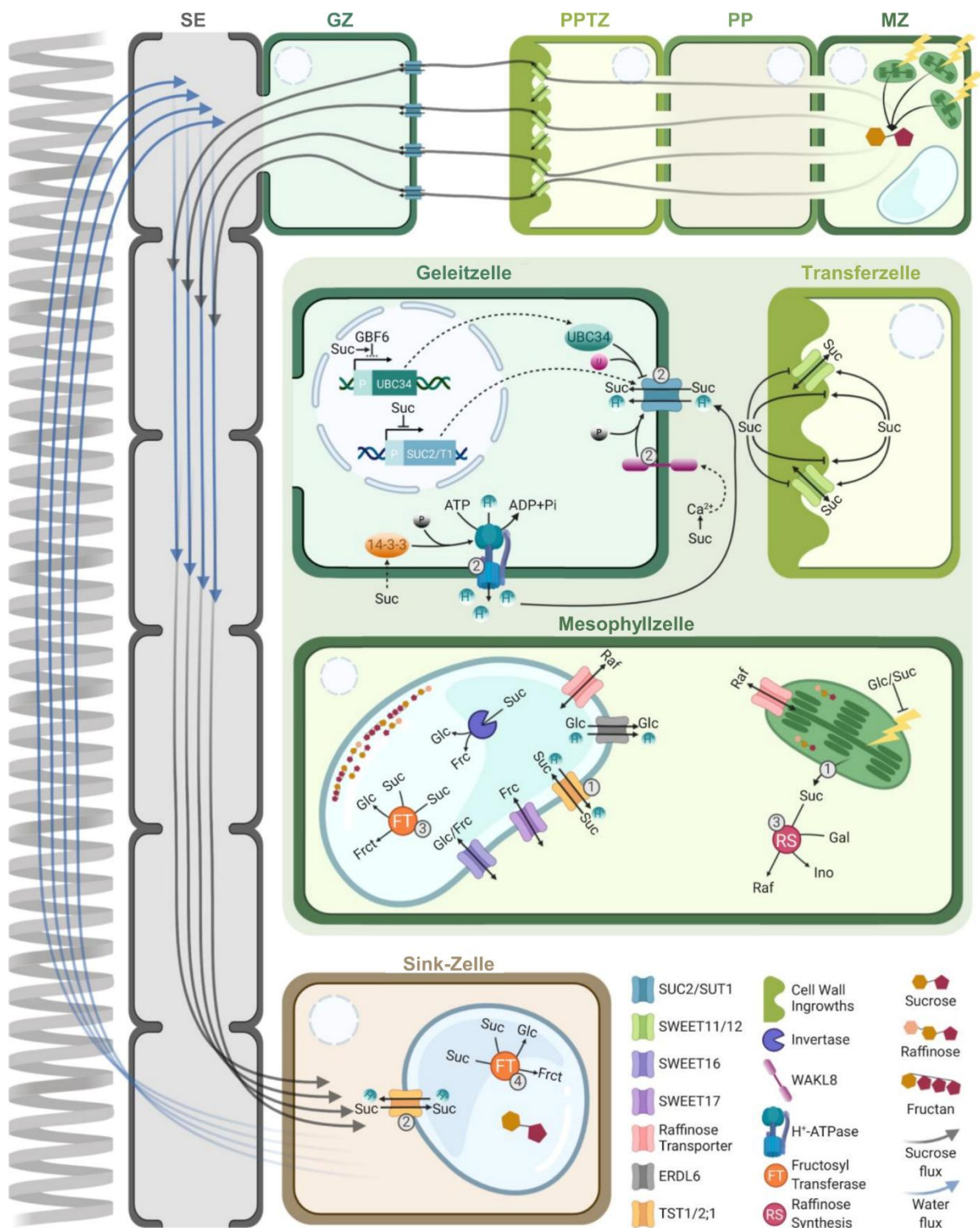


Abbildung 1.1 Verteilung des Zuckers in Pflanzen.

Die durch die Photosynthese in den Mesophyllzellen (MZ) produzierte Saccharose wird entweder direkt verstoffwechselt, in die Vakuole transportiert und sodann durch Invertasen gespalten, oder sie gelangt von den Mesophyllzellen in die Phloem-Parenchym-Transfer-Zellen (PPTZ), von wo sie über SWEET11/12-Transporter in den Apoplasten weitergeleitet wird. Apoplastisch lokalisierte Saccharose wird über den protonengekoppelten Importer SUC2/SUT1 in die Geleitzellen (GZ) geladen. Nach der Beladung der Geleitzellen gelangt die Saccharose über die Siebzellen (SE) durch Massentransport in die Sink-Zellen, wo sie entweder metabolisiert wird oder in die Vakuole in sehr hohen Konzentrationen akkumuliert. Dieser Prozess wird durch die vakuolären Zuckerimporter der TST-Proteine vermittelt. Diese Illustration wurde mit *BioRender.com* erstellt.

1.1.2 Regulation des Langstreckentransports

Da die photosynthetische Leistung in Abhängigkeit von der Tageszeit extrem schwankt (extrem z. B. während der Tag- und Nachtphasen) muss die Phloembeladung entsprechend der alternierenden Verfügbarkeit von Zuckern reguliert werden. Diese Regulation scheint auf verschiedenen molekularen Ebenen zu erfolgen:

Zum einen ändern sich die Mengen der Transkripte beteiligter Transporter wie auch die Mengen der Proteine selbst, mit einem jeweiligen Minimum am Ende der Nacht und einem Maximum am Ende des Tages (Kühn *et al.*, 1996). Die hohe Bedeutung der Transporter-Proteinabundanz wurde erst jüngst durch Studien weiter verdeutlicht (Xu *et al.*, 2020). In dieser Arbeit konnten gezeigt werden, dass das sogenannte UBC34-Protein den Phloem-loader Sucrose-Proton Symporter 2 (SUC2) ubiquitinylieren kann, wodurch der proteolytische Abbau des Transporters beschleunigt wird. Unter Bedingungen in denen der Phloemtransport erhöht werden muss, spielt aber offensichtlich auch die Energetisierung der korrespondierenden Plasmamembran eine Rolle. Durch eine reversible Phosphorylierung der P-ATPase kann diese in ihrer Aktivität modifiziert werden (Falhof *et al.*, 2016). An den Beispielen *Vicia faba* (Bouche-Pillon *et al.*, 1994; DeWitt und Sussman, 1995) und *Arabidopsis thaliana* (DeWitt *et al.*, 1991) wurde die Bedeutung geänderter Energetisierung der Geleitzellenplasmamembran für den Langstreckentransport schon vor vielen Jahren eindrücklich nachgewiesen.

Mit den zuvor beschriebenen Mechanismen haben Pflanzen einen effizienten Rückkopplungsmechanismus geschaffen, der die Zuckertransportrate im Phloem sowohl an die Zuckersynthese im *Source*-Gewebe wie an den Zuckerabfluss in den *Sink*-Gewebe anpassen kann. Kommt es dennoch zu einem unerwarteten Rückstau von Saccharose im Blatt, so wird sekundär die Photosyntheserate vermindert was eine weitere Zuckerakkumulation ausschließt (Krapp *et al.*, 1993). Dieser Mechanismus, der insbesondere auf eine Signalwirkung hoher zytosolischer Zuckerkonzentrationen im Blatt basiert, die zu einer verminderten Expression Photosynthese-assoziiierter Gene führen (Ramon *et al.*, 2008; Rolland *et al.*, 2006; Rolland *et al.*, 2002), ist insbesondere auch dann bedeutend wenn Stresssituationen auf Zuckersynthese und/oder auf den Verbrauch einwirken. Insbesondere bei abiotischen Stressreizen wie Temperaturänderungen, Änderungen der Wasserverfügbarkeit oder Lichtmengenänderungen kann es zu einem Konflikt zwischen der ausreichenden Versorgung der *Sink*-Gewebe mit Bausteinen und der Bereitstellung durch die *Source*-Gewebe kommen (Pommerrenig *et al.*, 2018).

1.2 Abiotischer Stress beeinflusst die Kohlenhydratverteilung

Wenn Pflanzen unter konstanten Umgebungsbedingungen im Labor wachsen, d.h. bei definierter Tageslänge, konstanter Luftfeuchtigkeit, Temperatur und Nährstoffversorgung,

schwankt ihr Zucker- und Stärkestoffwechsel in vergleichsweise geringen Spannen, die im Wesentlichen nur von den Licht-/Dunkelzyklen abhängen (Zeeman *et al.*, 2007). Jedoch, unter ambienten, d.h. natürlichen Bedingungen verläuft das Pflanzenwachstum bei sich ständig ändernden Umweltsituationen, was zu einer Vielzahl von Akklimatisierungs- und Adaptionsmechanismen im Hinblick auf Photosyntheseleistung, Kohlenstofffixierung und Kohlenhydratproduktion bzw. Konsumption führt (Garcia-Molina *et al.*, 2020; Garcia-Molina und Leister, 2020; Schwenkert *et al.*, 2022).

In diesem Zusammenhang ist insbesondere die Zuckerhomeostase zu erwähnen, da Zucker sehr markante protektive Funktionen im Hinblick auf Prozesse wie Aufrechterhaltung der osmotischen Balance, Membranstabilität oder Abwehr von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) besitzen (Bogdanović *et al.*, 2008; Hinch *et al.*, 2003; Keller, Müdsam, *et al.*, 2021; Lineberger und Steponkus, 1980; Santarius und Milde, 1977). Dies bedeutet, dass Pflanzen deren Umweltbedingungen kritische Bereiche verlassen sowohl ihre intrazelluläre Zuckerkompartimentierung anzupassen haben, aber auch den Zuckertransport zwischen *Source*- und *Sink*-Geweben modifizieren müssen (Keller, Martins Rodrigues, *et al.*, 2021; Patzke *et al.*, 2019; Pommerrenig *et al.*, 2018; Pommerrenig *et al.*, 2020; Trentmann *et al.*, 2020; Valifard *et al.*, 2021).

1.2.1 *Chilling* als Vorbereitung zur Stresstoleranz

Ein Beispiel für abiotischen Stress stellt die Veränderung der Umgebungstemperatur außerhalb des Bereichs der üblichen Schwankungen dar. Vor allem Kälte ist ein limitierender Faktor für die landwirtschaftliche Produktivität (Gollan *et al.*, 2017; Hussain *et al.*, 2018; Soualiou *et al.*, 2022). Pflanzen unterscheiden in ihrer Kältewahrnehmung zwischen Kälte (*Chilling*; 0-15 °C) und Frost (<0 °C). Beide Temperaturbereiche werden als „Kältestress“ definiert, der direkt zur Hemmung von Stoffwechselreaktionen und indirekt zu osmotischen, oxidativen und anderen Schädigungen führt (Thomashow, 1999, 2001; Yadav, 2010). Mit sinkenden Temperaturen verlangsamen sich die enzymatischen Reaktionen entsprechend dem van't-Hoff-Gesetz, was zu einer Dysfunktion des Metabolismus und damit zu einem Ungleichgewicht führt. Einhergehend mit dem Einsetzen der Kälte kommt es auch zu einem zellulären Wasserexport (Jan *et al.*, 2009), verminderter Membranfluidität und unspezifischen Schädigungen an weiteren zellulären Strukturen (Janda *et al.*, 2014). In der Summe bewirken diese Veränderungen einem unkontrollierten Austritt löslicher Teilchen, wie Metabolite und Ionen, was Wachstums- und Entwicklungsverzögerungen zur Folge hat (Yadav, 2010).

Insbesondere „höhere“ Pflanzen (Gefäßpflanzen) verfügen jedoch über Mechanismen zur Anpassung an geringe Umwelttemperaturen. Dieser als Kälteakklimatisierung bezeichnete Prozess (Bräutigam *et al.*, 2009; Crosatti *et al.*, 2013; Smallwood und Bowles, 2002) wird eingeleitet, wenn Pflanzen über einen bestimmten Zeitraum niedrigen, aber nicht

Frosttemperaturen ausgesetzt sind, was letztendlich zu einer erhöhten Frosttoleranz führen kann (Xin und Browse, 2000). Der Prozess der Kälteakklimatisierung wurde, wenig überraschend, auch an *Arabidopsis thaliana* detailliert erforscht und umfasst eine Vielzahl molekularer und physiologischer Änderungen wie Zucker- und Ionenakkumulation, Genexpressionsanpassungen, Membranmodifikationen, Synthese neuer Lipide oder Ca^{2+} Signaturveränderungen (Alberdi und Corcuera, 1991; Hoermiller *et al.*, 2017; Moellering *et al.*, 2010; Rekarte-Cowie *et al.*, 2008; Strand *et al.*, 2003; Strand *et al.*, 1997; Strand *et al.*, 1999; Zuther *et al.*, 2004). Die kontrollierten Änderungen dieser Prozesse ist insbesondere ausgeprägt in den sogenannten „frost hardy species“ (Bachmann *et al.*, 1994; Janda *et al.*, 2014; Lag *et al.*, 1991; Qian *et al.*, 2024; Santarius und Milde, 1977; Wang *et al.*, 2013).

1.2.2 Vakuolärer Transporter regulieren die intrazelluläre Zuckerverteilung

Aufgrund ihrer beachtlichen relativen Größe von bis zu 80 % des Zellvolumens (Martinoia *et al.*, 2007), spielt die Vakuole die Hauptrolle in der intrazellulären Zuckerspeicherung. Die Verteilung verschiedener Zucker zwischen Vakuole und Zytosol wird dynamisch mithilfe verschiedener Importer und Exporter reguliert, die entweder zur Familie der **MONO SACCHARIDE TRANSPORTER (MST)** (Slewinski, 2011), der **SUGARS WILL EVENTUALLY BE EXPORTED TRANSPORTER (SWEET)** (Eom *et al.*, 2015) oder der **SUCROSE TRANSPORTER (SUT)** (Schneider *et al.*, 2012; Schulz *et al.*, 2011) gehören (Pommerrenig *et al.*, 2018). Die einzelnen Mitglieder dieser Transportergruppen können teilweise spezifische aber auch überlappende Transportspezifitäten für verschiedene Mono- und Disaccharide aufweisen. Beispielsweise wird die Fruktose-Verteilung hauptsächlich durch SWEET17 reguliert (Chardon *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2010; Guo *et al.*, 2014), während die Glukose-Verteilung durch SWEET16 (Klemens *et al.*, 2013), den vakuolären Exportern **AtERDL6 (EARLY RESPONSE TO DEHYDRATION LIKE 6)** (Klemens *et al.*, 2014; Poschet *et al.*, 2011) und, in der Zuckerrübe, durch **BvIMP1 (INTEGRAL MEMBRAN PROTEIN 1)** (Klemens *et al.*, 2014) kontrolliert wird. Ein weiterer Transporter der für den Saccharose-Export aus der Vakuole wichtig ist, ist Saccharose/ H^+ -Symporter **SUCROSE CARRIER 4 (SUC4)**; auch als **SUT4 - Sucrose Transporter 4** bezeichnet) (Schneider *et al.*, 2012; Schulz *et al.*, 2011). Als bisher einzige eindeutig dokumentierte Zuckerimporter wurden die MST-Mitglieder der Subgruppe **TONOPLAST SUGAR TRANSPORTER (TSTs)** identifiziert (Cho *et al.*, 2010; Hedrich *et al.*, 2015; Jung *et al.*, 2015; Wormit *et al.*, 2006). Es gibt darüber hinaus noch das vakuoläre Protein **VGT1 (Vacuolar Glucose Transporter1)** der spezifisch den Glukose-Import katalysieren soll. Da die korrespondierende *loss-of-function* Mutante jedoch weder entsprechende Veränderungen im Zuckergehalt noch im Phänotypen aufweist (Aluri und Büttner, 2007) ist unklar, ob VGT1 in der Tat einen Zuckerimporter repräsentiert.

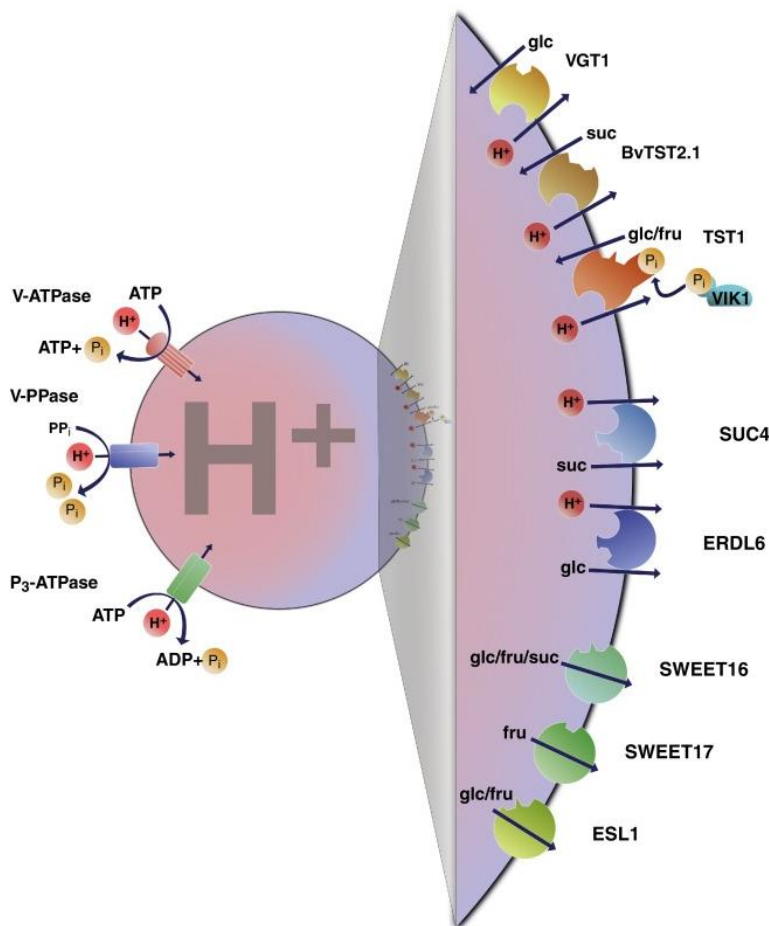


Abbildung 1.2 Vakuoläre Zuckertransporter und Protonenpumpen.

Der Tonoplast-Zuckerimporter TST aus Arabidopsis (zuvor als Tonoplasten-Monosaccharid-Transporter TMT bekannt) importiert Glukose und Fruktose im Austausch mit Protonen. Der Arabidopsis-Transporter VGT1 soll, unbewiesener Weise, als Glukose-spezifischer vakuolärer Zucker/Protonen-Antiporter agieren. Die TST-Aktivität wird durch die Proteinkinasen VIK1 und CIPK6 reguliert (Deng *et al.*, 2020; Wingenter *et al.*, 2011) wobei eine Phosphorylierung die Transport-Aktivität erhöht. Ein Homolog zum TST aus Arabidopsis, das *Beta vulgaris*-Protein TST2.1, ist hoch spezifisch für Saccharose und wurde als vakuolärer Saccharose-Belader in Zuckerrüben-Pfahlwurzeln identifiziert (Jung *et al.*, 2015). Die Protonen-/Zucker-Exporter SUC4 und ERDL6 nutzen den bestehenden elektrochemischen Gradienten über die Vakuolenmembran, während SWEET 16 und 17 und der ESL1

eine erleichterte Diffusionsprozesse katalysieren. Die starke protonenmotorische Kraft (proton motive force) entlang der Vakuolenmembran wird durch drei Protonenpumpen aufrechterhalten. Eine ATPase vom V-Typ, eine PPase und, in einigen wenigen Pflanzen-Arten zusätzlich durch eine ATPase vom Typ P3A/B (nach Hedrich *et al.*, 2015; modifiziert).

Unter den genannten Transporter-Gruppen sind die TSTs von besonderem Interesse, da sie eindeutig zur subzellulären Verteilung von Zuckern zwischen dem Zytosol und der Vakuole beitragen (Jung *et al.*, 2015; Schulz *et al.*, 2011; Wingenter *et al.*, 2010; Wormit *et al.*, 2006). TSTs bilden eine kleine Unterfamilie innerhalb der MSTs, die in den meisten diploiden Pflanzenarten drei Mitglieder umfasst und eine hohe Homologie untereinander aufweisen (Pommerrenig *et al.*, 2018; Wormit *et al.*, 2006). Die Arabidopsis-Proteine TST1 und TST2 wurden ursprünglich als vakuoläre Monosaccharid/Protonen-Antiporter charakterisiert (Wormit *et al.*, 2006), spätere elektrophysiologische Studien zeigten jedoch, dass TST1 auch in der Lage ist den protonengetriebenen Saccharose-Import zu katalysieren (Schulz *et al.*, 2011) (Vu *et al.*, 2020).

1.3 Chilling als Vorbereitung der Fortpflanzung von Zuckerrüben

Source-Gewebe sind Nettoproduzenten und *Sink*-Gewebe sind Nettokonsumenten von Kohlenhydraten. Die Aktivität von *Source*- und *Sink*-Geweben treibt das Wachstum und die Entwicklung von Pflanzen, insbesondere von Nutzpflanzen, an. Durch teilweise

jahrhundertelange Züchtung wurden Kulturpflanzensorten mit meist erhöhten Zuckergradienten zwischen den beiden Gewebetypen erzeugt (Lichthardt *et al.*, 2019; Reynolds *et al.*, 2009; Savage *et al.*, 2015). Ein prominentes Beispiel in diesem Zusammenhang verkörpert die Zuckerrübe (*Beta vulgaris*). Die Zuckerrübe ist eine sehr wichtige Kulturpflanze, die in den gemäßigten Zonen Europas und Nordamerikas kommerziell zur Zuckerproduktion angebaut wird. Zuckerrüben haben im Grunde einen zweijährigen Lebenszyklus, d.h., im ersten Wachstumsjahr bilden sie eine große Pfahlwurzel, die große Mengen an Saccharose speichert (bis zu 20% ihres Frischgewichts). Der vakuoläre Saccharose-Belader **TONOPLAST SUGAR TRANSPORTER 2;1** (*BVTST2;1*) spielt eine wesentliche Rolle bei der Zuckerakkumulation im Speichergewebe der Pfahlwurzel (Jung *et al.*, 2015). Im zweiten Wachstumsjahr entwickelt sich die Pfahlwurzel zu einem *Source*-Organ und stellt somit die zuvor gespeicherte Saccharose zur Verfügung, um das Wachstum des Blütenstandes und damit die anschließende Samenproduktion zu unterstützen.

Die Etablierung der Blühfähigkeit (oder des sog. „Schossens“) bei Zuckerrüben erfordert zwischen den beiden Wachstumszyklen eine längere Exposition bei Temperaturen unter 15 °C, die als Vernalisation bezeichnet wird (Boudry *et al.*, 2002). Die Entwicklung und das Wachstum des Blütenstands führt zu einem erheblichen Verlust an Zuckern und Biomasse in der Pfahlwurzel, und somit zu einem Nettoertragsverlust. Um diesen Ertragsverlust zu vermeiden werden Zuckerrüben in der Landwirtschaft stets als einjährige Kultur angebaut. D.h., sie werden im Frühjahr ausgesät und im Spätherbst des Jahres, kurz bevor die Photosynthese die Pfahlwurzeln nicht mehr mit Zucker versorgt, geerntet. Eine verlängerte Anbauphase (von Herbst bis Herbst) würde die Wachstumsperiode und damit die Zuckerbeladung der Pfahlwurzel verlängern und massive Ertragssteigerungen bewirken. Daher ist die zweijährige Anbaumöglichkeit der Zuckerrübe zu einem vorrangigen Züchtungsziel geworden (Hoffmann und Kenter, 2018; Hoffmann und Kluge-Severin, 2011).

1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

In den gemäßigten Klimazonen, wie beispielsweise Europa und Nordamerika ist die Zuckerrübe (*Beta vulgaris*) die bedeutendste Zuckerquelle (in Form von Saccharose) für die Lebensmittelindustrie. Obwohl es sich bei der Zuckerrübe um eine zweijährige Pflanzenart handelt, wird sie in o.g. Gebieten wegen ihrer ausgeprägten Frostempfindlichkeit als einjährige Pflanze angebaut. Somit ist die für den finalen Ertrag bedeutende Wachstumsphase zeitlich beschränkt und dieser Zeitraum fällt zudem in die wärmsten bzw. trockenen Sommermonate, was die Zucker-Anreicherung in der Pfahlwurzel negativ beeinflusst. Bei Aussaat der Zuckerrübe bereits im frühen Herbst (z.B. direkt im Anschluss an eine Ernte im September) könnte der Anbauzeitraum zum einen zeitlich ausgedehnt werden, zum anderen läge der Zeitraum der hauptsächlichen Biomasseakkumulation in den niederschlagsreichsten und somit

Wachstums-begünstigenden Monaten des Jahres (Jaggard *et al.*, 2009; Milford und Riley, 1980). Einem solchen Anbau als „Winterrübe“ steht jedoch (unabhängig von der kälteinduzierten Vernalisation) entgegen, dass es auf Grund der in den gemäßigten Breiten vorherrschenden Temperaturen im Winter zu massiven Gewebeschäden durch Eisbildung bei Frost kommen kann, welche zum Absterben der Pflanze (und damit dem agronomischen Totalverlust) führt.

In dieser Arbeit habe ich daher versucht zu ermitteln, wie die für das Schossen der zweijährigen Zuckerrüben unerlässlichen kühlen Temperaturen den Zuckerstoffwechsel, die Photosynthese, den Phloemtransport und letztlich die *Source*- und *Sink*-Identitäten von Sprossen und Speicherwurzeln der Zuckerrübe beeinflussen. Neben den grundlegenden erwarteten Erkenntnissen ist es auf deren Basis ggf. sogar möglich Züchtungsstrategien zu entwickeln, welche die Kältetoleranz von *Beta vulgaris* verbessern. Weitergehend wurden im Rahmen dieser Arbeit identifizierte Angriffsstellen hinsichtlich ihrer regulatorischen Wirkung auf die Kälteantwort von Zuckerrüben, entweder im Modell-Organismus *Arabidopsis thaliana* oder in Hybriden der Zuckerrübe untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Pflanzenmaterial

Für diese Arbeit wurden hybride Zuckerrüben (*Beta vulgaris*) mit unterschiedlichem Genotyp verwendet, welche von der KWS SAAT SE & Co KGaA (Einbeck, Deutschland) zur Verfügung gestellt wurden. Zusätzlich zur Beprobung der entsprechenden 0-Segregante wurden Zuckerrüben mit heterologer Expression des Gens für den Transporter TST1 aus *Arabidopsis thaliana* und einer Überexpression des Transporter-Gens *BvTST2;1* verwendet.

Weitere Untersuchungen dieser Arbeit wurden an der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* der Varietät Columbia durchgeführt. Zusätzlich zur Arbeit an korrespondierenden Wildtyp-Pflanzen wurden Pflanzen analysiert, die Transporter-Gene aus Zuckerrüben unter der Kontrolle eines Cauliflower Mosaic Virus 35S (CaMV 35S)-Promotors exprimieren. Darüber hinaus wurden eine $\Delta tst2-1$ -Mutante mit *BvSUT4*-Expression sowie eine $\Delta atsut4$ -Mutante in einige Analysen einbezogen.

Tabelle 1.1 Verwendete Pflanzen-Linien

	Benennung	Eigenschaft	Pflanze
	GT1	varrierende Merkmale bei Feldversuchen	<i>Beta vulgaris</i>
	GT2	varrierende Merkmale bei Feldversuchen	<i>Beta vulgaris</i>
	GT3	varrierende Merkmale bei Feldversuchen	<i>Beta vulgaris</i>
	TST0.1	<i>AtTST</i> -Expression	<i>Beta vulgaris</i>
	TST0.4	<i>AtTST</i> -Expression	<i>Beta vulgaris</i>
	8706	<i>BvTST2;1</i> -Expression	<i>Beta vulgaris</i>
	8707	<i>BvTST2;1</i> -Expression	<i>Beta vulgaris</i>
	8708	<i>BvTST2;1</i> -Expression	<i>Beta vulgaris</i>
	8709	<i>BvTST2;1</i> -Expression	<i>Beta vulgaris</i>
	8762	<i>BvTST2;1</i> -Expression	<i>Beta vulgaris</i>
	8763	<i>BvTST2;1</i> -Expression	<i>Beta vulgaris</i>
	#4-5	35S:: <i>BvSUT4</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
	#4-6	35S:: <i>BvSUT4</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
	#4-1	$\Delta tst2-1$:: <i>BvSUT4</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
	$\Delta atsut4$	$\Delta atsut4$	<i>Arabidopsis thaliana</i>
	#4-5	35S:: <i>BvIMP2</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
	#1-8	35S:: <i>BvIMP2</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>

2.2 Pflanzenanzucht und Ernte

Alle in dieser Arbeit untersuchten Pflanzen wurden unter kontrollierten Klimakammerbedingungen angezogen. Insofern nicht anders angegeben erfolgte die Anzucht auf ED73-Einheitserde (Einheitserdwerke Patzer, Sinntal, Deutschland) mit 10% (v/v) Sand unter Kurztagbedingungen (10h Licht/14h Dunkelheit) bei 60% relativer Luftfeuchtigkeit und einer Lichtintensität von $110 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}^1$. Eine gleichmäßige Keimung wurde durch Stratifizierung der Samen für 48 h bei 4 °C im Dunkeln gewährleistet (Weigel, 2002).

Die Ernte der Zuckerrübenpflanzen erfolgte durch Zerlegung in Spross- und Pfahlwurzelgewebe. Bei Arabidopsis-Pflanzen wurde hingegen die gesamte Rosette geerntet. Alle Proben wurden zerkleinert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C gelagert.

ED73-Einheitserde:

0.3 g/l N

0.3 g/l P_2O_5

0.6 g/l K_2O

3,0 g/l KCl

Für die Analysen in Kapitel 3.1 wurden Zuckerrüben GT1, GT2 und GT3 unterschiedlichen Kältebedingungen ausgesetzt. Zur Untersuchung der Wachstums- und Zuckerakkumulationskinetik wurden die Pflanzen zunächst sechs Wochen bei 20 °C kultiviert, anschließend für eine Woche auf 12 °C und danach für drei Wochen auf 4 °C überführt. Die Ernte erfolgte vier Stunden nach Lichtbeginn bei 20 °C sowie an Tag 5, 9 und 19 nach dem Transfer auf 4 °C. Für RNA-seq, Proteom- und Metabolit-Analysen wurden die Pflanzen hingegen zehn Wochen bei 20 °C angezogen, anschließend für eine Woche auf 12 °C und zwei Wochen auf 4 °C gehalten, wobei Kontrollpflanzen durchgehend bei 20 °C kultiviert wurden. Außerdem erfolgte eine unabhängige Analyse mit 15 Wochen alten Pflanzen, die für eine Woche bei 12 °C und zwei Wochen bei 4 °C kultiviert wurden. Zur Ernte wurden für jedes Gewebe und jeden Genotyp mindestens drei Pools aus je vier Pflanzen gebildet, die als biologische Replikate dienten.

Zur Analyse der *BvSUT4*-exprimierenden Arabidopsis-Pflanzen in Kapitel 3.2.1 sowie der *BvIMP2*-exprimierenden Pflanzen in Kapitel 3.2.2 wurden diese nach Stratifizierung und zehnwöchiger Anzucht bei 20 °C für drei Tage auf 4 °C transferiert. Als Referenz wurden am Abend (zehn Stunden nach Lichtbeginn) und unmittelbar vor dem Transfer auf 4 °C am Morgen (unmittelbar nach Lichtbeginn) Proben genommen. Anschließend wurden die Pflanzen ebenfalls am Morgen und am Abend beprobt.

Für die Analyse der *BvIMP2*-Expression und der Zuckerdynamik in assimilierenden und konsumierenden Blättern von Zuckerrübenpflanzen in Kapitel 3.2.2.8 wurden nach sechswöchiger Anzucht alle Blätter der Pflanzen, bis auf ein photosynthetisch aktives Blatt, lichtdicht abgedeckt. Die Abdunkelung erfolgte mithilfe von lichtundurchlässiger Aluminiumfolie, die sorgfältig um die Blattspreiten gewickelt wurde. Pro Pflanze wurde sowohl ein belichtetes als auch ein abgedunkeltes Blatt beprobt. Die Probenahmen erfolgten zu den Zeitpunkten 0, 8, 24 und 32 Stunden nach Beginn der Abdunklung. Das belichtete Blatt diente als Referenz für assimilierende Blätter, das abgedunkelte als konsumierendes Gewebe.

Die in Kapitel 3.2.3 untersuchten *AtTST1*-exprimierenden Zuckerrüben wurden zunächst sechs Wochen bei 20 °C kultiviert, anschließend für eine Woche auf 12 °C und danach für 40 Tage auf 4 °C überführt. Die Ernte erfolgte vier Stunden sowie sieben Tage nach der Lichtbeginn bei 12 °C sowie an Tag 0, 7, 15, 29 und 40 nach dem Transfer auf 4 °C.

Die in Kapitel 3.2.4 untersuchten *BvTST2;1*-überexprimierenden Zuckerrüben wurden zunächst sechs Wochen bei 20 °C kultiviert, anschließend für eine Woche auf 12 °C und danach für 2 Wochen auf 4 °C, eine Woche auf -5 °C und wieder eine Woche auf 4 °C überführt. Die Ernte erfolgte unmittelbar vor Transfer auf 12 °C sowie unmittelbar vor Frost von -5 °C (Tag 21 nach Transfer) und eine Woche nach Frosteinwirkung (Tag 35 nach Transfer).

2.3 Bestimmung des Wassergehaltes

Zur Ermittlung des Wassergehalts wurde das Frischgewicht der Proben direkt nach der Ernte bestimmt. Anschließend erfolgte die Gefriertrocknung im Alpha 2-4 LD plus Gefriertrockner (Christ, Osterode am Harz, Deutschland) bis zur vollständigen Wasserabgabe. Nach erneutem Wiegen wurde der Wassergehalt als Differenz aus Frisch- und Trockengewicht berechnet und auf ein Gramm Trockengewicht normiert. Die getrockneten Proben wurden für die anschließende Analyse von Zucker- und Stärkegehalten verwendet.

2.4 Pflanzenphysiologische Methoden

2.4.1 Elektrokonduktivität

Die elektrische Leitfähigkeit gefrorenen Blattgewebes von *BvIMP2*- oder *BvSUT4*-exprimierenden Arabidopsis-Pflanzen wurde an fünf Wochen alten Pflanzen untersucht, die vier Tage lang bei 4 °C akklimatisiert wurden. Als Referenz wurde dieselbe Anzahl an Pflanzen bei 20 °C belassen. Ein voll entwickeltes Blatt (n = 6 Pflanzen) wurde in ein Reagenzglas mit 2 ml sterilem entionisiertem Wasser gegeben. Die Röhrchen wurden für eine Stunde bei 0 °C in einem Kryostat inkubiert und anschließend stündlich um 1 °C bis zu einer Mindesttemperatur von -6 °C abgekühlt (Abbildung 2.1). Das Einfrieren des Wassers im Inneren der Glasröhrchen wurde bei -1 °C mit einer vereisten Impföse induziert. Anschließend

wurden die Reagenzgläser über Nacht bei 4 °C aufgetaut und anschließend eine weitere Nacht in einer 4 °C-Kammer geschüttelt. Nach dem Auftauen wurden die Reagenzgläser mit 3 ml sterilem entionisiertem Wasser aufgefüllt und eine weitere Stunde lang bei Raumtemperatur vorsichtig geschüttelt. Die elektrische Leitfähigkeit jeder Probe wurde bei Raumtemperatur mit einem WTW LF521-Leitfähigkeitsmessgerät (WTW GmbH, Weilheim, Deutschland) quantifiziert und mit der elektrischen Gesamtleitfähigkeit nach zweistündigem Kochen und Schütteln über Nacht verglichen.

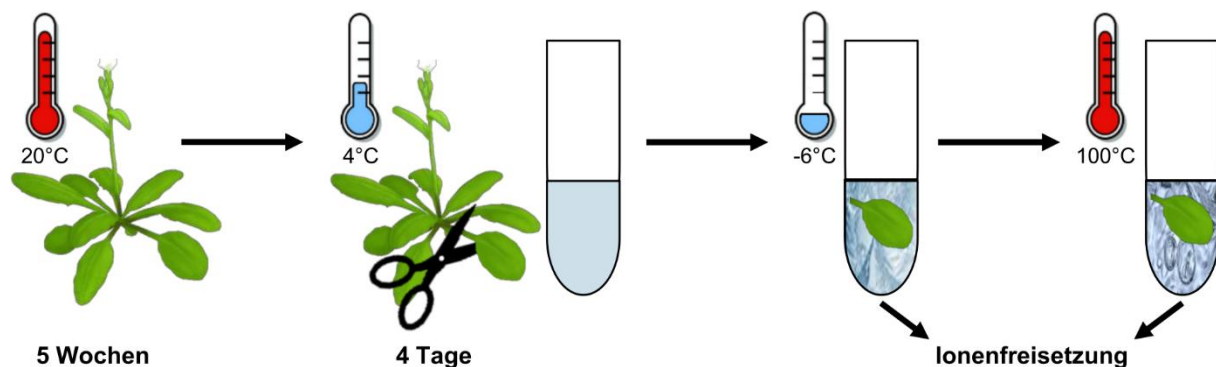


Abbildung 2.1 Versuchsaufbau zur Messung der elektrischen Leitfähigkeit von Arabidopsis-Blättern.

Die Messung der elektrischen Leitfähigkeit an Zuckerrüben erfolgte an fünf Wochen alten Pflanzen, welche zunächst eine Woche bei 12 °C und weitere fünf Wochen bei 4 °C akklimatisiert wurden (Abbildung 2.2A). Eine Frostapplikation von -5 °C erfolgte für zwei Stunden an der intakten Pflanze mit anschließender Regeneration bei 4 °C für 24 Stunden. Aufgrund der Größe wurden im Gegensatz zur Messung an Arabidopsis-Blättern im Fall der Zuckerrübe Blatt- sowie Rübenscheiben zur Messung der Elektrokonduktivität verwendet. Eine Probenentnahme erfolgte alle 5-10 Minuten für insgesamt zwei Stunden (Abbildung 2.2B). Die elektrische Leitfähigkeit jeder Probe wurde bei Raumtemperatur mit einem WTW LF521-Leitfähigkeitsmessgerät (WTW GmbH, Weilheim, Deutschland) quantifiziert und mit der elektrischen Gesamtleitfähigkeit nach zweistündigem Kochen und Schütteln über Nacht verglichen.

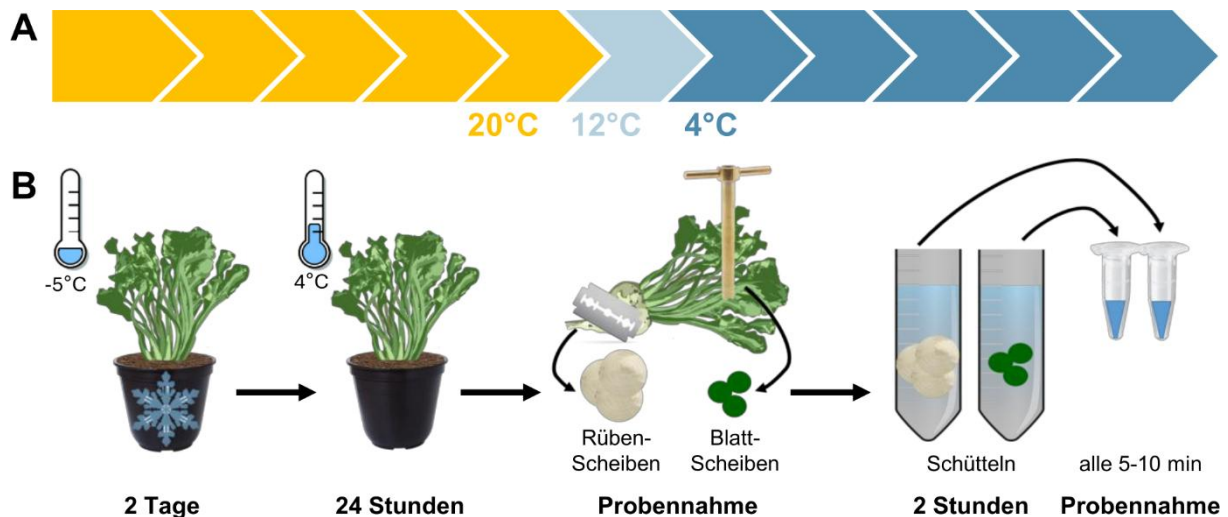


Abbildung 2.2 Versuchsaufbau zur Messung der elektrischen Leitfähigkeit von Zuckerrüben.

(A) Schema der dem Versuchsbeginn vorangegangenen Zuckerrübenanzucht. (B) Schema der Methode der elektrischen Leitfähigkeit des Sprosses sowie der Wurzel von Zuckerrüben.

2.4.2 Pulsamplitudenmodulations (PAM)-Fluorometrie

Die PAM-Fluorometrie stellt eine nicht-invasive Methode dar, bei der die Photosyntheseaktivität von Pflanzen durch Messung der Chlorophyll-Fluoreszenz analysiert werden kann.

Die photosynthetische Aktivität von vier einzelnen Pflanzen pro Genotyp wurde in einem zeitlichen Kinetik-Experiment mit einem Imaging-PAM M-Series System (Heinz Walz, Effeltrich, Deutschland) gemessen. Die Pflanzen wurden 12 Minuten lang im Dunkeln gehalten, um die Energie von PSII zu verbrauchen. Die Kapazität von PSII wurde durch Sättigung mit 14 Zyklen von Lichtimpulsen mit photosynthetisch aktiver Strahlung (PAR; $76 \mu\text{mol}_{\text{Photonen}}/\text{m}^2\text{s}^1$) bei 0, 50 und 70 Sekunden gemessen. Die aufgezeichnete Fluoreszenz wurde zur Berechnung der effektiven Quantenausbeute von PSII [$Y(II)$], des nicht-photochemischen Quenching [$Y(NPQ)$] und der nicht-regulierten Energiedissipation [$Y(NO)$] verwendet.

Die effektive Quantenausbeute des Photosystems II $Y(II)$ stellt die tatsächliche Menge an Lichtquanten dar, die photochemisch genutzt werden können und lässt demnach Rückschlüsse auf die Effizienz des Photosyntheseapparats zu. Die regulierte Wärmeabstrahlung $Y(NPQ)$ wird durch überschüssige Energie aus blauem Licht verursacht, welches nicht photochemisch genutzt werden kann. Kann die Energie aus den Lichtquanten nicht in Form von Wärme abgestrahlt werden, zeugt dies von einer ineffizienten photochemischen Umwandlung und Protektion des Systems. Das Maß an ineffizienter nicht-regulierter Energieabstrahlung wird durch den Parameter $Y(NO)$ beschrieben.

Die erforderlichen Faktoren wurden nach den folgenden Formeln berechnet:

$$Y(II) = (Fm' - F)/Fm'$$

$$Y(NPQ) = 1 - Y(II) - 1/(NPQ + 1 + qL(Fm/Fo - 1))$$

$$Y(NO) = 1/(NPQ + 1 + qL(Fm/Fo - 1))$$

$$NPQ = (Fm - Fm')/Fm'$$

$$qN = (Fm - Fm')/(Fm - Fo')$$

$$Fo' = Fo/(Fv/Fm + Fo/Fm')$$

$$qP = (Fm' - F)/(Fm' - Fo')$$

$$qL = (Fm' - F)/(Fm' - Fo') \times Fo'/F = qP \times Fo'/F$$

2.4.3 Assay zur Translokation von radioaktiv markierter Saccharose

Für diese Analyse wurden zehn bis zwölf Wochen alte Zuckerrübenpflanzen verwendet, die bei 20 °C unter Kurztagbedingungen (10 h Licht/14 h Dunkelheit) kultiviert wurden. Pflanzen, die einer Kältebehandlung unterzogen wurden, verbrachten eine weitere Woche bei 12 °C, gefolgt von sechs bis sieben Tagen bei 4 °C. Zur Injektion wurde die obere Hälfte der Pfahlwurzel teilweise von Erde befreit und (ca. 1 cm unterhalb der Bodenoberfläche) mit einem Biopsiestanzer ein 1-mm-Loch ausgestanzt. Anschließend wurden 10 µl einer 50%igen (v/v) radioaktiv markierten Saccharoselösung (536 mCi/mmol; Hartmann Analytic, Braunschweig, Deutschland) in die Vertiefung gegeben und mit einem Tropfen Vaseline versiegelt. Die Pflanzen wurden daraufhin für weitere 10 Tage entweder bei 4 °C oder als Kontrolle bei 20 °C gehalten.

Nach Abschluss der Behandlung wurden alle *Source*-Blätter der injizierten Pflanzen abgetrennt, zwischen Löschpapier gepresst und getrocknet. Zur Analyse der Radioaktivität in den Pfahlwurzeln wurden diese ausgegraben, gewaschen und mit einem Trüffelhobel in dünne Scheiben (ca. 0,5 mm) geschnitten, die anschließend zwischen Blottingpapier gepresst wurden. Die Radioaktivität wurde mittels Phosphorbildplatten erfasst (Expositionszeit: vier bis fünf Stunden auf der adaxialen Blattoberfläche oder den getrockneten Pfahlwurzelscheiben) und anschließend mit einem Cyclone Storage Phosphor Screen (Packard Bioscience, Dreieich, Germany) ausgewertet.

Zur Quantifizierung der Radioaktivität in den Blattstielen wurden die Blattstiele derselben Blätter, die für das Phosphorimaging verwendet wurden, abgeschnitten, gemörsert und pulverisiert. Jeweils 5 bis 10 mg des Pulvers wurden mit 2 ml Szintillationscocktail versetzt, und die Radioaktivität als counts per minute (cpm) mit einem TRI-Carb 2810TR Flüssigszintillationsanalysator (Perkin Elmer, Waltham, USA) bestimmt.

2.4.4 Gasaustausch-Messungen

Zur Analyse der gasaustauschbezogenen Parameter wurde ein GFS-3000-System (Heinz Walz, Effeltrich, Deutschland) verwendet. Die Messungen erfolgten an vier Einzelpflanzen pro Genotyp im Rahmen einer zeitlichen Kinetik. Mithilfe einer 2,5 cm³-Gasaustauschküvette wurden die CO₂-Assimilationsrate, die Atmung, die Blatt-CO₂-Konzentration sowie die Transpirationsrate in *Source*-Blättern der Zuckerrüben bestimmt, wobei Bereiche mit ausgeprägten zentralen Mittelrippen ausgeschlossen wurden.

Die Bedingungen in der Küvette wurden bezüglich der Temperatur, der Luftfeuchtigkeit und der CO₂-Konzentration an die Wachstumsbedingungen der Pflanzen angepasst. Optimale Messintervalle wurden in Vorversuchen ermittelt, indem die Zeitspanne bestimmt wurde, die für eine Stabilisierung des CO₂-Flusses nach Einbringen des Blattabschnitts sowie für die Anpassung an wechselnde Lichtintensitäten erforderlich war. Die Messungen begannen nach einer Stabilisierungsphase von etwa fünf Minuten.

Die Lichtintensität wurde zunächst für 460 s auf eine photosynthetisch aktive Strahlung (PAR) von 125 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ eingestellt, gefolgt von drei aufeinanderfolgenden CO₂/Wasseraustauschmessungen mit jeweils 30 s Dauer. Anschließend wurde die Lichtintensität für 320 s auf PAR 0 reduziert, und es erfolgten erneut drei CO₂/Wasseraustauschmessungen von je 30 s. Zwischen den einzelnen Messungen wurde ein 30-s-Intervall eingehalten, um eine erneute Stabilisierung der Messwerte zu gewährleisten.

2.4.5 Atmung von Zuckerrüben-Pfahlwurzelgewebe

Die Atmung von Pfahlwurzeln wurde gemessen, indem 0,5 cm³ große Gewebewürfel aus zentralen Pfahlwurzelbereichen herausgeschnitten und die CO₂-Produktion in einer Ganzpflanzenküvette mit einem Volumen von 60 cm³ gemessen wurde. Die Werte wurden auf das Gewebegewicht normiert.

2.4.6 Isolierung von Pfahlwurzelvakuolen und vakuolären Proteinen

Die Isolation der Vakuolen erfolgte in Anlehnung an Jung *et al.* (2015) mit folgenden Modifikationen. Die Pfahlwurzeln wurden zunächst mit einem Trüffelhobel in dünne Scheiben (~0,5 mm) geschnitten und anschließend mit einer Rasierklinge in kleine Würfel zerteilt. Diese wurden in 130 ml Sammelpuffer überführt und für 15 Minuten unter leichtem Schütteln auf Eis inkubiert.

Nach der Inkubation wurde die Lösung zunächst durch ein Küchensieb und anschließend durch ein Edelstahlsieb mit einer Maschenweite von 125 μm filtriert. Die Vakuolen wurden durch Zentrifugation (2000 g, 10 min, 4 °C) sedimentiert, in 40 ml Zentrifugationspuffer resuspendiert und anschließend in einem Sorvall SS-34 Festwinkelrotor (1000 g, 15 min, 4 °C)

erneut zentrifugiert. Intakte Vakuolen, die auf der oberen Phase des sich selbst bildenden Nycodenz-Gradienten schwammen, wurden in 1-ml-Fraktionen aliquotiert, wobei jede Fraktion 1 µl Pefabloc-Proteaseinhibitor enthielt.

Zur Präzipitation des vakuolären Proteoms wurde den Proben 20%ige Trichloressigsäure im Verhältnis 1:1 (v/v) zugegeben, gefolgt von einer einstündigen Inkubation bei -20 °C. Die Proteine wurden durch Zentrifugation (20.000 g, 10 min, 4 °C) pelletiert und zweimal mit 100% Ethanol sowie 100% Aceton gewaschen. Das resultierende Proteinpellet wurde in 8 M Harnstoff resuspendiert und für die massenspektrometrische Analyse verwendet. Flüssigchromatographie und Tandem-Massenspektrometrie wurden gemäß Jung *et al.* (2015) durchgeführt.

Sammelpuffer:

750 mM Mannitol

5 mM EDTA, pH 8

50 mM Tris-HCl, pH 7,6

1 mM DTT

Zentrifugationspuffer:

Sammelpuffer

30% (w/v) Nycodenz (AxisShield Oslo, Norwegen)

2.5 Funktionelle Analysen

2.5.1 Extraktion löslicher Proteine

Zur Extraktion löslicher Proteine wurden die Pflanzen geerntet, gewaschen und unter gekühlten Bedingungen in Pfahlwurzeln und *Source*-Blätter getrennt. Das gefrorene Blattgewebe wurde in flüssigem Stickstoff mit einer Retsch-Mühle (Retsch, Haan, Deutschland) zu feinem Pulver verarbeitet. Anschließend wurden 100 mg des pulverisierten Gewebes mit 800 µl Puffer E1 in 1,5-ml-Mikrofugenröhrchen suspendiert. Nach kurzem Schütteln wurden die Proben für drei Minuten bei 12.000 g und 4 °C zentrifugiert.

Zur Reinigung wurden 500 µl des Überstands auf eine mit Puffer E1 (ohne Triton X-100) voräquilibrierte Sephadex NAP5 (G25)-Säule (GE Healthcare, Düsseldorf, Deutschland) aufgetragen. Die eluierte Lösung wurde in vorgekühlten Mikroröhrchen gesammelt und bei -20 °C gelagert.

Die Extraktion aus Pfahlwurzelgewebe erfolgte analog, jedoch mit einigen Anpassungen. Die Pfahlwurzeln wurden direkt mit Puffer E1 bei 4 °C homogenisiert, bis ein gleichmäßiger Brei entstand. Dieser wurde zunächst durch ein Küchensieb filtriert und anschließend zentrifugiert. Zur weiteren Reinigung wurden 5 ml des Überstands für 48 Stunden durch eine Membran mit

einer Porengröße von 12 kDa gegen 2 Liter destilliertes, entionisiertes Wasser dialysiert. Das Wasser wurde dabei sieben- bis achtmal ausgetauscht.

Die aufgereinigten Proben wurden entweder direkt für enzymatische Tests verwendet oder bei -20 °C gelagert. Flüssigchromatographie und Tandem-Massenspektrometrie wurden gemäß Jung *et al.* (2015).

Puffer E1:

50 mM HEPES-KOH (pH 7,5)

10 mM MgCl₂

1 mM EDTA (pH 7,5)

2 mM DTT

1 mM PMSF

1 mM Pefabloc (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)

5 mM Aminohexansäure

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

10 % (v/v) Glycerin

2.5.2 Aufnahmestudien an *Xenopus laevis* Oozyten

Die Methode der funktionellen Expression membranständiger Transporter in *Xenopus laevis* Oozyten inklusive der Mikroinjektion von cRNA und die anschließenden Aufnahmestudien orientiert sich an etablierten Protokollen zur Untersuchung von Membrantransportproteinen, wurde jedoch gemäß den Anforderungen dieser Studie angepasst und wie in den folgenden Kapiteln beschrieben durchgeführt (Haferkamp und Linka, 2012; Sigel, 1990; Sigel und Minier, 2005).

2.5.2.1 cRNA-Synthese

Die Aufnahmestudien erfordern die Verwendung eines oozytenfähigen Plasmids, wie beispielsweise pGEM-HEJuel, pNB1 oder pOO2, das das Gen von Interesse (GOI) enthält. Zur Synthese der cRNA wurde das Plasmid mittels Restriktionsenzymen linearisiert.

10 µl BvIMP2 in pNB1 (529,40ng/µl)

20 µl Green Buffer for FastDigest

10 µl EcoRI FastDigest

160 µl H₂O

Das linearisierte Fragment wurde über Agarosegelelektrophorese aufgetrennt, extrahiert und mit dem NucleoSpin® Gel and PCR Clean Up Kit eluiert (2 × 10 µl H₂O, 117 ng/µl). Die Transkription in cRNA erfolgte mithilfe des mMESSAGING mMACHINE Kits.

25 µl	2x NTC/CAP
5 µl	10x Reaction Buffer
9 µl	Linearisiertes BvIMP2 in pNB1 (117 ng/µl)
2 µl	Enzyme Mix

Nach einer Inkubation bei 37 °C für 1,5 Stunden wurde 1 µl TURBO DNase zugegeben, gefolgt von einer weiteren 15-minütigen Inkubation. Die cRNA wurde durch Zugabe von 50 µl LiCl (7,5 M, 50 mM EDTA) bei -20 °C für mindestens 30 Minuten gefällt, zentrifugiert und das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen. Die finale cRNA wurde in nucleasefreiem Wasser gelöst und die Konzentration mittels NanoDrop bestimmt.

2.5.2.2 Herstellung der Injektionsnadeln

Zur Herstellung der Injektionsnadeln, werden zuvor autoklavierte Glaskapillaren mit einer Länge von 15 cm und äußerem/innerem Durchmesser von 1,5/0,86mm in eine Vorrichtung (Puller von Narishige Group, Tokyo, Japan) eingespannt, welche magnetisch auseinandergezogen werden kann. Durch das zeitgleiche mittige Erhitzen der Kapillare entstehen zwei noch geschlossene Injektionsnadeln. Der Magnet wurde auf einen Wert von 3 und die Heizvorrichtung auf einen Wert von 4,2 eingestellt, um optimale Nadeln zu erzeugen.

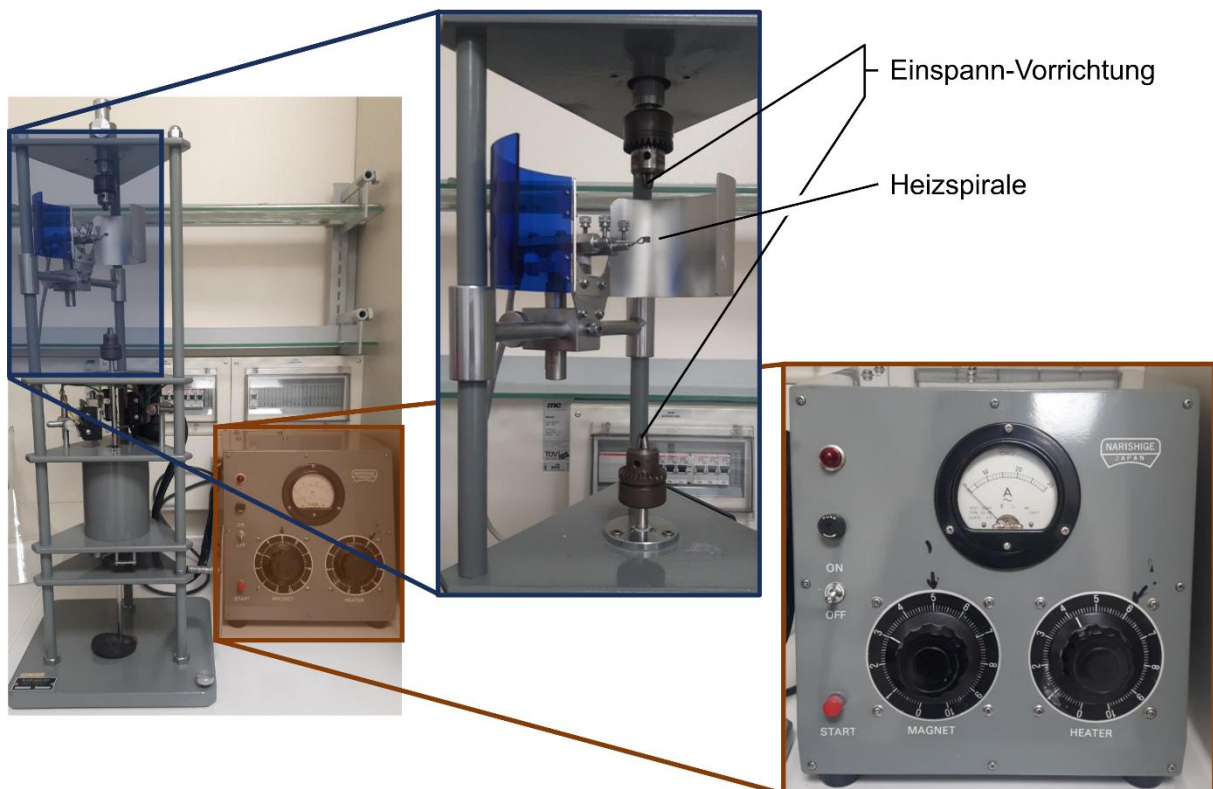


Abbildung 2.3 Vorrichtung (Puller) zur Herstellung von Injektionsnadeln.

2.5.2.3 Mikroinjektion von *Xenopus laevis* Oozyten

Für die Mikroinjektion wurden entkollidierte Oozyten bei EcoCyte Bioscience (Dortmund, Deutschland) bestellt und in O-R2 bei 4 °C gelagert. Die cRNA wurde auf die gewünschte Konzentration eingestellt, ein Injektionsschema erstellt und die Oozyten mit der cRNA injiziert. Die 6-Well-Platten wurden entsprechend beschriftet und vorbereitet. Weitere Details zur Mikroinjektion sind aus Aguero *et al.* (2018) zu entnehmen.

Solution A (1L)

11,915 g	HEPES
48,221 g	NaCl
1,864 g	KCl
1,47 g	CaCl ₂ – 2H ₂ O
2,03 g	MgCl ₂ – 6H ₂ O
1,520 g	NaOH

in ddH₂O und bei 4-8 °C lagern

Solution B (1L)

1,420 g Na₂HPO₄
in ddH₂O und bei 4-8 °C lagern

Oocyte Reagent 2 (O-R2)

100 ml	Solution A
100 ml	Solution B
798 ml	ddH ₂ O
1 ml	Gentamycin Stock
1 ml	Streptomycin Stock

etwa 1-2 Monate haltbar

Aufnahme-Medium

1mM	Sacch/Frk/Glk
25µL	¹⁴ C Zucker auf 975 µL Zucker-Lösung

gelöst in O-R2

2.5.3 SPS-Assay

Für diesen Test wurden 80 µg lösliches Protein zu 200 µl frisch zubereitetem Emax-Puffer sowie zu Elim und Eblank gegeben. Die Proben wurden 20 Minuten bei 25 °C inkubiert und anschließend durch Erhitzen auf 95 °C für 5 Minuten inaktiviert. Danach erfolgte eine Zentrifugation bei 12.000 g und 4 °C für 5 Minuten. Anschließend wurden 100 µl des Überstandes mit 100 µl 5 M KOH vermischt und für 10 Minuten bei 95 °C inkubiert. Zur Farbentwicklung wurde die Lösung mit 800 µl Anthron-Reagenz (14,6 M H₂SO₄ und 0,14 %

[Gew./Vol.] Anthron) versetzt, und die Absorption wurde unmittelbar bei 620 nm gemessen. Ein Kalibrierstandard wurde mit Konzentrationen von 0 bis 5 mmol Saccharose erstellt.

Für diesen Test wurden 80 µg lösliches Protein zu 200 µl frisch zubereitetem $E_{\max}$, $E_{\lim}$ und E_{blank} . Die Proben wurden 20 Minuten lang bei 25 °C inkubiert, dann 5 Minuten bei 95 °C, um die Reaktion zu stoppen, und 5 Minuten lang bei 12.000 g bei 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurden 100 µl des Überstandes in 100 µl 5 M KOH pipettiert und 10 Minuten bei 95 °C inkubiert. Die Lösung wurde mit 800 µl Anthron (14,6 M H₂SO₄ und 0,14 % [Gew./Vol.] Anthron) gemischt, und die Absorption wurde sofort bei 620 nm gemessen. Ein Eichstandard wurde mit 0 bis 5 mmol Saccharose hergestellt.

E_{max}:

50 mM HEPES-KOH (pH 7,5)
20 mM KCl
4 mM MgCl₂
12 mM UDP-Glc
10 mM Fructose-6-Phosphat zu Glucose-6-Phosphat

E_{lim}:

50 mM HEPES-KOH (pH 7,5)
20 mM KCl
4 mM MgCl₂
4 mM UDP-Glc
2 mM Fructose-6-Phosphat zu Glucose-6-Phosphat
5 mM KH₂PO₄

E_{blank}:

E_{max} ohne UDP-Glucose und Zuckerphosphate)

2.6 Mikroskopie

2.6.1 Subzelluläre Lokalisierung von BvSUT4 und BvIMP2 in verschiedenen Pflanzensystemen

Zur Untersuchung der subzellulären Lokalisierung wurden die kodierenden Sequenzen von BvSUT4 und BvIMP2 jeweils in Gateway-kompatible Vektoren (pENTR™/D-TOPO®; Life Technologies, seit 2014 Teil von Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) kloniert, sequenziert und für die Erzeugung von 35S-promotorgetriebenen GFP-Fusionskonstrukten verwendet (Karimi *et al.*, 2002).

Die transienten Expressionen erfolgten in verschiedenen Pflanzensystemen: Für *Arabidopsis thaliana* und Zuckerrüben (*Beta vulgaris*) wurden Mesophyll-Protoplasten isoliert und

transformiert (Abel und Theologis, 1994; Nieberl *et al.*, 2017). In beiden Systemen zeigte sich eine konsistente Tonoplastenlokalisierung des *BvSUT4*-GFP-Fusionsproteins. Für *BvIMP2* wurde die GFP-Fusionskonstruktion in ein *Agrobacterium tumefaciens*-System eingeführt und in *Nicotiana benthamiana* transient exprimiert (Sparkes *et al.*, 2006). Die GFP-Fluoreszenzsignale wurden mittels konfokaler Lasermikroskopie (Leica TCS SP52; Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland) detektiert.

2.6.2 In Planta Esculin-Transport

Für die Analyse wurden zehn Wochen alte Zuckerrübenpflanzen verwendet, die bei 20 °C unter Kurztagbedingungen (10 h Licht/14 h Dunkelheit) kultiviert wurden. Ein *Source*-Blatt pro Pflanze wurde auf der Oberseite (adaxial) mit feinem Sandpapier (Körnung 800) vorsichtig angeraut. Anschließend wurden etwa 500 µl einer 100 mM Esculin-Sesquihydrat-Lösung (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) mit einer Plastikpipette gleichmäßig auf die behandelte Blattoberfläche aufgetragen. Die Blätter wurden mit Plastikfolie abgedeckt, zwei Tage lang bei 20 °C inkubiert und anschließend entweder auf 4 °C gekühlt oder weiterhin bei 20 °C gehalten (Kontrolle).

Nach fünf bis sieben Tagen in der Kälte wurden nicht mit Esculin behandelte *Source*-Blätter entfernt. Abschnitte der Blattstiele wurden mit einem konfokalen Mikroskop (TCS SP5II, Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland) unter Verwendung eines HCX PL APO Lambda Blue 20.0x0.70 IMM UV-Objektivs auf Esculin-Fluoreszenz untersucht. Zusätzlich wurden Querschnitte der Pfahlwurzeln derselben Pflanzen analysiert, um zu bestätigen, dass Esculin sowohl bei kältebehandelten als auch bei Kontrollpflanzen erfolgreich in die Pfahlwurzeln verlagert wurde. Die Emissionsbandbreiten für den Nachweis der Fluoreszenz lagen bei 440–465 nm für Esculin und 594–631 nm für Lignin.

2.7 Metabolitextraktion und -quantifizierung

2.7.1 Extraktion löslicher Metabolite aus Pflanzengewebe

Blätter und bei Zuckerrüben auch die Pfahlwurzeln wurden geerntet, in flüssigem Stickstoff eingefroren, gefriergetrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Das pulverisierte Pflanzenmaterial wurde zweimal mit jeweils 1 ml 80%igem (v/v) Ethanol bei 80 °C für eine Stunde extrahiert. Die kombinierten Extrakte wurden im Vakuumkonzentrator (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) eingedampft, und die verbleibenden Pellets in destilliertem, deionisiertem Wasser gelöst.

2.7.1.1 Extraktion und Verdau von Stärke

Zur Extraktion der Stärke wurde das verbleibende Pellet mit 80%igem Ethanol gewaschen und anschließend in 1 ml destilliertem, deionisiertem Wasser resuspendiert. Danach wurden 200 µl Wasser zugegeben, und die Probe für 40 Minuten bei 121 °C autoklaviert.

Danach folgte eine enzymatische Spaltung der Glukose-Einheiten für 4 h durch Zugabe von jeweils 5 Units der α-Amylase und der Amyloglucosidase in 200 mM Natriumacetat (pH 4,8) bei 37 °C und 600 rpm. Durch das Erhitzen der Proben für 10 min auf 95 °C wurde diese Reaktion abgestoppt. Nach dem Abkühlen wurden die Proben für 10 min bei 20.000 g zentrifugiert, um die Pelletreste zu sedimentieren. Der resultierende Überstand wurde zur quantitativen Bestimmung des Stärke-Gehalts genutzt.

2.7.1.2 Enzymatische Zucker- und Stärkequantifizierung

Die extrahierten Zucker sowie die hydrolytisch gespaltene Stärke wurden mithilfe eines NAD⁺-gekoppelten enzymatischen Assays bestimmt (Stitt *et al.*, 1989).

Hierfür wurden 10 µl der jeweiligen Probe mit 190 µl eines Prämixes versetzt. Der Prämix katalysiert aufgrund der Anwesenheit aller benötigten Enzyme und Kofaktoren die Reaktion von Glukose zu 6-Phosphogluconolacton, wobei NAD⁺ zu NADH reduziert wird, welches gegenteilig zu NAD⁺ bei einer Wellenlänge von 340 nm ein Absorptionsmaximum aufweist. Die Ansätze mit einem Volumen von 200 µl wurden demnach in je ein Well einer 96-Well-Platte überführt, woraufhin die Extinktion der Proben bei einer Wellenlänge 340 nm mittels des Tecan-PlateReaders Infinite M200 gemessen wurde. Infolgedessen wurde zeitgleich 1 µl Hexokinase in jede Probe gegeben und erneut die Extinktion gemessen. Durch die Subtraktion der ersten Extinktion von der zweiten Extinktion erhält man die reine Extinktion der Probe. Anhand des Lambert-Beerschen Gesetzes konnte die Konzentration an NADH berechnet werden, welche direkt auf den Stärke-Gehalt übertragen werden kann.

Prämix:

100 mM HEPES pH 7,5
10 mM MgCl₂
2 mM ATP
0,8 mM NAD
5,5 U Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase

Das Lambert-Beersche Gesetz:

$$E = \epsilon \cdot c \cdot d$$

ϵ = mikromolarer Extinktionskoeffizient (für NADH bei 340 nm = 6,22 cm³/(µmol*cm))

c = Konzentration (µmol/cm³)

d = Schichtdicke (für Well in 96-Well-Platte = 0,64 cm)

E = Extinktion

2.7.2 Ionenchromatographische (IC) Messungen

Durch die IC-Messung mit einer 761 IC-Compact-Anlage (Methrom, Herisau, Schweiz) auf einer Metrosep A Supp1-250 (Methrom, Herisau, Schweiz) kann eine Ladungstrennung verschiedener Substanzen bewirkt werden. Die Ionenaustauschchromatographie beruht auf der Eigenschaft von Metaboliten an polare, feste Adsorbenten je nach Art und Größe verschieden stark zu binden. Die Adsorbenten, die die stationäre Phase bilden, kommen entweder als Anionen- oder Kationenaustauscher, meist auf Basis eines Polymermaterials, vor. Dabei wird die Ladung des Adsorbenten durch Gegenionen ausgeglichen. Die Probe wird bei dieser Chromatographie mit einem Druck von 5 MPa über die Säule gepumpt. Zur Elution der Metabolite wird eine mobile Phase aus verschiedenen Elektrolyten verwendet. Die unterschiedlichen Affinitäten der Metabolite zur Säule führen zu unterschiedlichen Retentionszeiten, mit der die Metabolite getrennt werden und ihre Leitfähigkeit detektiert wird.

2.7.3 Analyse der phosphorylierter Metabolite

Der Gehalt an phosphorylierten Zwischenprodukten (Glukose-6-Phosphat, Fruktose-6-Phosphat, Saccharose-6-Phosphat, UDP-Glukose und UDP) wurde nach Horst *et al.* (2010) bestimmt.

2.8 Molekularbiologische Methoden

2.8.1 Isolation von RNA zur Expressionsanalyse mittels RNA-Sequenzierung (RNASeq)

2.8.1.1 RNA-Extraktion und Reinigung

Die RNA zur späteren Expressionsanalyse wurde aus drei biologischen Replikaten pro Genotyp, Gewebe (Blatt und Wurzel) und Behandlung isoliert. Die Isolierung erfolgte durch Dr. Wolfgang Zierer (FAU Erlangen). Dazu wurden etwa 100 mg des gefrorenen Pflanzenmaterials in einem Gewebe-Lysator (Qiagen, Hilden, Deutschland) bei 30 Hz für 90 Sekunden zerkleinert und anschließend erneut in flüssigem Stickstoff überführt. Die Proben wurden mit 1,5 ml QIAzol Lysis-Reagenz (Qiagen) versetzt, dreimal für jeweils 30 Sekunden vortexet und bei 4 °C für 10 Minuten bei 12.000 g zentrifugiert.

Der Überstand wurde mit 300 µl Chloroform extrahiert, 15 Sekunden vortexet und 15 Minuten bei 4 °C und 12.000 g zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde abgenommen und mit 750 µl Isopropanol gefällt (10 Minuten bei RT), anschließend für 15 Minuten bei 4 °C und 12.000 g zentrifugiert. Das RNA-Pellet wurde mit 75 % (v/v) Ethanol gewaschen, getrocknet und in Diethylpyrocarbonat (DEPC)-behandeltem Wasser resuspendiert. Um verbleibende

Verunreinigungen zu entfernen, wurde die RNA mit dem RNeasy-Kit (Qiagen) weiter aufgereinigt, entsprechend den Herstellerangaben.

Vor der Weiterverarbeitung wurde die isolierte und gereinigte RNA mittels NanoDrop 2000/2000c (Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Deutschland) quantifiziert. Die Qualität wurde mit einem Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer (Agilent, Santa Clara, USA) überprüft.

2.8.1.2 cDNA-Synthese und RNA Sequenzierung

Pro Probe wurden 2 µg RNA in cDNA transkribiert und mit dem Illumina HiSeq 2000 System sequenziert. Sequenzierung und Assemblierung wurden als kundenspezifische Dienstleistung (GATC) durchgeführt.

2.8.1.3 Datenanalyse

Die statistische Analyse umfasste die Normalisierung der Daten, eine grafische Untersuchung der rohen und normalisierten Werte, Tests auf differentielle Expression zwischen den Bedingungen sowie die Anpassung der Roh-P-Werte. Die Analyse erfolgte mit der R-Software (R Core Team, 2017), Bioconductor-Paketen (Gentleman *et al.*, 2004) einschließlich DESeq2 (Anders und Huber, 2010; Love *et al.*, 2014) sowie dem am PF2-Institut Pasteur entwickelten SRATools-Paket.

2.8.2 Isolation von RNA zur Expressionsanalyse mittels quantitativer real time PCR (qPCR)

Für die Expressionsanalysen mittels quantitativer real-time PCR (qPCR) wurde die RNA mit dem NucleoSpin® RNA Plant Kit (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) gemäß den Herstellerangaben isoliert. Dazu wurden etwa 50 mg Pflanzenmaterial verarbeitet, und die finale Elution der RNA erfolgte in 30 µl RNase-freiem ddH₂O. Vor der weiteren Verwendung wurde die RNA-Qualität mittels NanoDrop 2000/2000c (Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Deutschland) überprüft.

2.8.2.1 cDNA-Synthese

Zur Synthese der komplementären DNA (*complementary DNA*; cDNA) wurde 1 µg isolierte RNA als Template verwendet. Die revers-transkription erfolgte mit dem qScript™ cDNA-Synthese-Kit (Quanta Biosciences, heute QuantaBio, Beverly, Massachusetts, USA) gemäß Herstellerprotokoll. Vor der quantitativen Analyse wurde die synthetisierte cDNA im Verhältnis 1:10 mit ddH₂O verdünnt.

2.8.2.2 Expressionsanalysen mittels qPCR

Die quantitative real-time PCR wurde mit einem CFX96™ Real-Time PCR System (Bio-Rad, Feldkirchen, Deutschland) durchgeführt. Die Detektion der amplifizierten DNA erfolgte durch Interkalation des Fluoreszenzfarbstoffs SYBR® Green (iQ™ SYBR® Green; Bio-Rad Laboratories, Feldkirchen, Deutschland) in die doppelsträngige DNA. Die Expressionsdaten wurden mithilfe der modifizierten $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode normiert (Livak und Schmittgen, 2001).

Die Zusammensetzung eines typischen Reaktionsansatzes zur qPCR ist in Tabelle 1.2 dargestellt, während Tabelle 1.3 die verwendeten thermischen Zyklusbedingungen beschreibt.

Tabelle 1.2 Zusammensetzung eines qPCR-Ansatzes

Substanz	Volumen [μl]
iQ SYBR® Green	5
Primer forward (10 mM)	1
Primer reverse (10 mM)	1
ddH ₂ O	1
cDNA (1:10 verdünnt)	2

Tabelle 1.3 Standard-qPCR-Programm

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit
Initiale Denaturierung	95	3 min
Denaturierung	95	} 44x 10 sec
Annealing/Elongation	58	
		45 sec

2.8.2.3 Oligonukleotide (Primer)

Die Auswahl bzw. das Design der Primer für die qPCR erfolgte mit Hilfe des Onlinetools Primer3web (Version 4.1.0; <https://primer3.ut.ee/>; Koressaar und Remm, 2007; Untergasser et al., 2012). Zur Normalisierung der Genexpression diente Bv7_172340_kzsr.t1 als Referenzgen bei der Zuckerrübe, während in *Arabidopsis thaliana* AT2G28390 verwendet wurde. Die Synthese der Oligonukleotide erfolgte durch die Sigma-Aldrich (Tochtergesellschaft von Merck, Darmstadt, Deutschland).

Tabelle 1.4 Verwendete Primer.

Aufgelistet sind alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Primer, einschließlich des Zielgens, der Bezeichnung, der Sequenz in 5'-3'-Richtung sowie der Länge des Amplifikationsprodukts in Basenpaaren.

Gen-Identifikator	Bezeichnung	Primersequenz (5'-3')	Amplifikationsprodukt (bp)
Bv7_172340_kzsr.t1	BvUGD1c+172f	AGCAAGTTTCATCAGGCAGC	120
	BvUGD1c+292r	GGCAAAGGTTTCTGGGTCAG	
Bv7_176780_srgi.t1	BvHXK1c+471f	CGAGTGAAATTGGGTGGCAA	150

	BvHXK1c+621r	CTTCACCTTCCGTTGCAACA	
Bv1_012190_rzko.t1	BvCAB1c+128f BvCAB1c+282r	AGCAAGTTTCATCAGGCAGC GGCAAAGGTTTCTGGGTCAG	157
Bv6_125480_qhip.t1	BvIMP2c+1292f BvIMP2c+1447r	CTAGTATAAAAGGCCTTGCTGGC CCACAAATATCACAGTAAAAGCAG	155
Bv4_083560_egiw.t1	BvSUT2c+1554f BvSUT2c+1662r	AGGAGGTGGTCAAGGATTGG TCCTCCACCAAATAAGGCGT	108
Bv1_000710_gzum.t1	BvSUT1c+1432f BvSUT1c+1566r	TGGGATGCATTGTTTGGTGG ACCCATTGACCCTCCGATTT	153
Bv5_124860_zpft.t1	BvSUT4+1242f BvSUT4+1407r	TGACACTGACTGGATGGGTC CCCAGAACCCAACTTCTTGC	165
Bv5_115690_zuju.t1	BvTST2;1+1148f BvTST2;1+1340r	GTGGTGAGGTTATTGGCGAC CCAACAATAATGCACGCCT	192
Bv5_115690_zuju.t1	gTST2.1+1011f gTST2.1+1961r	CGAGGAATGGGATGACGAGA GGGAAGATCTCAGCGCAAAG	950
Bv5_115690_zuju.t1	AtTST2;1opt+1011f AtTST2;1opt+1246r	CGAGGAATGGGATGACGAGA CGAGGAATGGGATGACGAGA	235
Bv6_125480_qhip.t1	BvIMP2+1292f BvIMP2+1447r	CTAGTATAAAAGGCCTTGCTGGC CCACAAATATCACAGTAAAAGCAG	155
Bv5_124860_zpft.t1	BvSUT4+1242f BvSUT4+1407r	TGACACTGACTGGATGGGTC CCCAGAACCCAACTTCTTGC	165
AT2G28390	AtSAND+681f AtSAND+751r	CAAGGCAGGAAATCACCAGGTTG CTGTACAGCTGATGCAGACCAG	70
AT1G22710	AtSUC2c+1346f AtSUC2c+1413r	TAGCCATTGTCGTCCCTCAGATG ACCACCGAATAGTTTCGTCTGAATGG	67
AT1G20840	AtTST1+1880f AtTST1+2051r	TGCTTCTTCGTGATGGGTTACGGT CCAAC TAGTCCGATCGAGCT	171

2.9 Computergestützte Analysen

2.9.1 Phylogenetische Analysen

Multiple Sequenzalignments von Aminosäuresequenzen verschiedener Proteine wurden mit Clustal Omega (Sievers *et al.*, 2011) durchgeführt. Die Bayes'sche phylogenetische Analyse wurde mit MrBayes Version 3.2.6 (Ronquist *et al.*, 2012) durchgeführt. MrBayes wurde ausgeführt, indem zwei parallele Metropolis-gekoppelte Monte-Carlo-Markov-Ketten-Analysen mit mindestens 20.000 Generationen durchgeführt wurden. Die Standardabweichung der Split-Häufigkeiten lag unter 0,005. Die Konsensbäume wurde mit FigTree v.1.4.3 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>) visualisiert.

2.9.2 Abbildungen

Die Abbildungen wurden unter Verwendung von Microsoft Excel, Microsoft PowerPoint und BioRender.com erstellt. Zur Darstellung der RNA-seq-Daten wurde eine Heatmap auf Basis

der durchschnittlichen Counts per Million (cpm) generiert. Die Visualisierung erfolgte mit ClustVis (Metsalu und Vilo, 2015).

2.9.3 Statistik

Die statistische Auswertung umfasste den Student's *t*-Test sowie ein- und zweifaktorielle Varianzanalyse (ANOVA). Der *t*-Test wurde in Microsoft Excel durchgeführt, während der einfaktorielle ANOVA mit post-hoc Tukey HSD Test mithilfe eines Online-Rechners von Navendu Vasavada (https://astatsa.com/OneWay_Anova_with_TukeyHSD) erfolgte. Für den zweifaktorielle ANOVA mit post-hoc Tukey HSD Test kam OriginPro (OriginLab Corporation, 2021; Northhamton, USA) zum Einsatz.

2.9.4 Gen-Identifikatoren

Die folgenden Zugangsnummern wurden aus TAIR (<https://www.arabidopsis.org/>; Berardini *et al.*, 2015) für Gene aus *Arabidopsis thaliana* (At), RefBeet 1.2 (<http://bvseq.boku.ac.at>; Dohm *et al.*, 2014) für *Beta vulgaris* (Bv) oder Genbank für Gerste (*Hordeum vulgare*; Hv), *Saccharum officinarum* (Sof) und Kartoffel (*Solanum tuberosum*; St) entnommen.

Tabelle 1.5 Gen-Identifikatoren.

Aufgelistet sind alle im Rahmen dieser Arbeit genannten Gen-Identifikatoren, einschließlich der trivialen Bezeichnung und der Spezies.

Bezeichnung	Gen-Identifikator	Spezies
AtERDL4	AT1G19450	<i>Arabidopsis thaliana</i>
AtERDL6	AT1G75220	<i>Arabidopsis thaliana</i>
AtSAND	AT2G28390	<i>Arabidopsis thaliana</i>
AtSPSA1	AT5G20280	<i>Arabidopsis thaliana</i>
AtSPSA2	AT5G11110	<i>Arabidopsis thaliana</i>
AtSPSB	AT1G04920	<i>Arabidopsis thaliana</i>
AtSPSC	AT4G10120	<i>Arabidopsis thaliana</i>
AtSUC1	AT1G71880	<i>Arabidopsis thaliana</i>
AtSUC2	AT1G22710	<i>Arabidopsis thaliana</i>
AtSUC3	AT2G02860	<i>Arabidopsis thaliana</i>
AtSUC4	AT1G09960	<i>Arabidopsis thaliana</i>
AtSUC5	AT1G71890	<i>Arabidopsis thaliana</i>
AtSUC9	AT5G06170	<i>Arabidopsis thaliana</i>
AtSUS1	AT5G20830	<i>Arabidopsis thaliana</i>
AtSUS2	AT5G49190	<i>Arabidopsis thaliana</i>
AtSUS3	AT4G02280	<i>Arabidopsis thaliana</i>
AtSUS4	AT3G43190	<i>Arabidopsis thaliana</i>
AtSUS5	AT5G37180	<i>Arabidopsis thaliana</i>
AtSUS6	AT4G02280	<i>Arabidopsis thaliana</i>
AtSUC4	AT1G09960	<i>Arabidopsis thaliana</i>
AtTST1	AT1G20840	<i>Arabidopsis thaliana</i>
BvBBX19	Bv9_216430_rwmw.t1	<i>Beta vulgaris</i>
BvBTC1	Bv2_045920_gycn.t1	<i>Beta vulgaris</i>

BvCAB1	Bv1_012190_rzko.t1	<i>Beta vulgaris</i>
BvCDF1	Bv2_046860_ofna.t1	<i>Beta vulgaris</i>
BvCOL1	Bv2_028660_twpr.t1	<i>Beta vulgaris</i>
BvFB	Bv1_012190_rzko.t1	<i>Beta vulgaris</i>
BvFL1	Bv6_150530_jqqr.t1	<i>Beta vulgaris</i>
BvFLK	Bv4_083560_egiw.t1	<i>Beta vulgaris</i>
BvFT1	Bv9_214250_miuf.t1	<i>Beta vulgaris</i>
BvFT2	Bv4_074700_eewx.t1	<i>Beta vulgaris</i>
BvFVE	Bv7_176780_srgi.t1	<i>Beta vulgaris</i>
BvH XK1	Bv7_176780_srgi.t1	<i>Beta vulgaris</i>
BvIMP1	Bv1_018520_zugk.t1	<i>Beta vulgaris</i>
BvIMP2	Bv6_125480_qhip.t1	<i>Beta vulgaris</i>
BvPC	Bv_004160_hgjn.t1	<i>Beta vulgaris</i>
BvRBCS	Bv2_026840_jyys.t1	<i>Beta vulgaris</i>
BvRCA	Bv2_025300_tzou.t1	<i>Beta vulgaris</i>
BvSPSA1	Bv2_030670_mgoq.t1	<i>Beta vulgaris</i>
BvSPSA2	Bv8_193450_doak.t1	<i>Beta vulgaris</i>
BvSUC4	Bv5_124860_zpft.t1	<i>Beta vulgaris</i>
BvSUS1	Bv8_190960_nnny.t1	<i>Beta vulgaris</i>
BvSUS2	Bv7_163460_jmqz.t1	<i>Beta vulgaris</i>
BvSUS3	Bv7_173620_ffuo.t1	<i>Beta vulgaris</i>
BvSUS4	Bv4_084720_myet.t1	<i>Beta vulgaris</i>
BvSUT1	Bv1_000710_gzum.t1	<i>Beta vulgaris</i>
BvSUT2	Bv4_083560_egiw.t1	<i>Beta vulgaris</i>
BvSUT3	Bv6_154300_yemu.t1	<i>Beta vulgaris</i>
BvSUT4	Bv5_124860_zpft.t1	<i>Beta vulgaris</i>
BvTST2;1	Bv5_115690_zuju.t1	<i>Beta vulgaris</i>
BvUGD1	Bv7_172340_kzsr.t1	<i>Beta vulgaris</i>
HvSPS1	AF261107.1	<i>Hordeum vulgare</i>
SofSPS1F	AB001338.1	<i>Saccharum officinarum</i>
StSUS1	NP_001275237	<i>Solanum tuberosum</i>
StSUS2	NP_001274911	<i>Solanum tuberosum</i>

2.10 Kooperationen und Unterstützung

Die in Kapitel 3.1 dargestellten Ergebnisse entstanden in Zusammenarbeit der Teilprojekte A (Prof. Dr. H. Ekkehard Neuhaus; Technische Universität Kaiserslautern, heute Rheinland-Pfälzische Technische Universität Kaiserslautern-Landau) und B (Prof. Dr. Uwe Sonnewald; Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg) sowie der industriellen Partner KWS SAAT SE (Herr Dr. Wolfgang Koch) und Südzucker AG (Herr Dr. Karsten Harms) im Rahmen des durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) geförderten Projekts BETAHIEMIS (Förderkennzeichen 031B0185).

3 Ergebnisse

Unter natürlichen Wachstumsbedingungen durchlaufen zweijährige Zuckerrüben vor Beginn der reproduktiven Phase ein erstes Jahr einer vegetativen Phase, welche zur Akkumulation von Saccharose genutzt wird. In den gemäßigten Breiten kann die Zuckerrübe aufgrund ihrer Kältesensitivität besonders im jungen Stadium lediglich im Frühling (März/April) ausgesät und bis in den Herbst (September/Oktober) kultiviert werden. Eine potenzielle Wachstumsphase von 12 Monaten ist demnach auf ein halbes Jahr reduziert, zudem fällt der Anbauzeitraum in die wärmsten und zunehmend trockenen Sommermonate, beides Faktoren, welche die Zuckerakkumulation in der Pfahlwurzel negativ beeinflussen. Eine Aussaat der Zuckerrübe bereits im frühen Herbst würde zusätzlich zur Ausdehnung des Zeitraums zur Ertragsanreicherung außerdem zu einer Verschiebung des Zeitraums der hauptsächlich Biomassenakkumulation in die niederschlagsreichsten und somit Wachstums begünstigenden Monaten des Jahres führen (Jaggard *et al.*, 2009; Milford und Riley, 1980). Ein solches Anbauverfahren könnte Berechnungen zur Folge, zu einer Ertragserhöhung um bis zu 26% führen (Hoffmann und Kluge-Severin, 2011). Unabhängig von der kälteinduzierten Vernalisation, steht einem Anbau als „Winterrübe“ außerdem entgegen, dass es aufgrund der in gemäßigten Breiten vorherrschenden Wintertemperaturen zu deutlichen Gewebeschäden durch Eisbildung bei Frost kommen kann, die zum Absterben der Pflanze führen.

3.1 Analyse des Wechsels der *Source-Sink*-Identität bei Zuckerrüben hinsichtlich der Regulation des Blühverhaltens und der Frosttoleranz

Zur Entwicklung von Strategien zur Verbesserung der Kälte- bzw. Frosttoleranz von *Beta vulgaris* muss zunächst das Verhalten der Zuckerrübe unter Kälte analysiert werden. Da eine adäquate Akklimatisierung bei 4 °C sowohl zur Erhöhung der Frosttoleranz wie für das Schossen der zweijähriger Zuckerrüben unabdingbar ist, wurde zunächst der Einfluss von Kälte auf den Zuckerstoffwechsel, die Photosyntheseaktivität, den Phloemtransport und schließlich die *Source* bzw. *Sink*-Identität der assimilierenden bzw. konsumierenden Gewebe von drei unterschiedlichen Genotypen untersucht.

3.1.1 Kälteexposition verursacht eine rapiden Abnahme des Spross- und Wurzel-Wassergehalts, aber nicht der Spross-Biomasseproduktion

Analysiert wurde die kälteabhängige Wachstumsdynamik der Zucker-produzierenden und Zucker-konsumierenden Organe von Zuckerrüben in drei zweijährigen Hybridgenotypen (GT1, GT2 und GT3). Diese Genotypen wurden gezielt aufgrund ihrer unterschiedlichen Reaktionen

auf Kältebedingungen ausgewählt, die sich in Voruntersuchungen gezeigt hatten. Während Zuckerrübe generell als frostempfindliche Kultur gilt, weisen einzelne Genotypen Unterschiede in ihrer Fähigkeit auf, niedrige Temperaturen zu tolerieren. Diese Unterschiede äußern sich unter anderem im Ausmaß der Schädigung von Blatt- und Wurzelgewebe sowie im Überleben der Pflanzen nach längerer Kälteeinwirkung. Basierend auf von der KWS SAAT SE & Co. KGaA durchgeführten Screenings wurden daher drei kontrastierende Genotypen ausgewählt, um gezielt deren kälteinduzierte physiologische Anpassungen zu untersuchen. Die Pflanzen wurden unter Kurztagbedingungen (10h Licht/ 14h Dunkelheit) zunächst für 6 Wochen unter Kontrollbedingungen (20 °C) angezogen, dann für eine Woche bei 12 °C akklimatisiert und anschließend für 19 Tage in kalte Temperaturbedingungen (4 °C) überführt. In diesem Stadium, welchem in etwa dem Stadium 19 bis 31 der Skala der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, das Bundessortenamt und die Chemische Industrie (BBCH-Skala; Meier, 2018) entspricht, hatten die Pflanzen bereits eine in etwa daumengroße Pfahlwurzel entwickelt.

Im Verlauf der 4 °C-Exposition wurde das Blatt- und Pfahlwurzelgewicht nach 5, 10 und 20 Tagen für eine Untergruppe von Pflanzen ermittelt (Abbildung 3.1A bis C). Das Blatt-Trockengewicht, nicht aber das Frischgewicht, nahm während der Kälteexposition weiter zu (Abbildung 3.1A und 1B). Übereinstimmend nahm der Wassergehalt der Blätter schrittweise bis zum Ende der Phänotypisierungs-Phase um fast 50% ab (Abbildung 3.1C). Gleichzeitig nahmen das Frischgewicht und das Trockengewicht der Pfahlwurzel, zusammen mit dem Wassergehalt, während der Kälteexposition ab (Abbildung 3.1A bis C). Diese Ergebnisse belegen, dass das Wachstum der Pfahlwurzeln stärker durch die Kälte beeinträchtigt wurde als das Wachstum des Sprosses und sie deuten zudem auf individuelle physiologische und metabolische Reaktionen auf die Kälteexposition der beiden Gewebe hin.

3.1.2 Der Zuckerspiegel reagiert im Spross und der Pfahlwurzel unterschiedlich auf Kälte

Die Akkumulation löslicher Zucker in Blättern ist eine generelle Reaktion auf niedrige Temperaturen und ein Merkmal des Kälteakklimatisierungsprozesses bei vielen Pflanzenarten (Steponkus, 1971; Strand *et al.*, 1997; Wolfe und Bryant, 1999). Entsprechend dieser Beobachtung konnte in den Blättern, die für die Ermittlung der Biomasse und des Wassergehalts verwendet wurden, ein deutlicher Anstieg der Glukose- und Fruktose-Konzentrationen (Abbildung 3.1D und E) und in geringerem Ausmaß auch für das Disaccharid Saccharose (Abbildung 3.1F) nach Transfer auf 4 °C festgestellt. Im Gegensatz zu den löslichen Zuckern nahm der Blattstärkegehalt nach Transfer auf 4 °C bei allen drei Genotypen rapide ab und erreichte Tiefstwerte von 20 bis 33% verglichen zum Ausgangsgehalt vor dem Kältetransfer (Abbildung 3.1G).

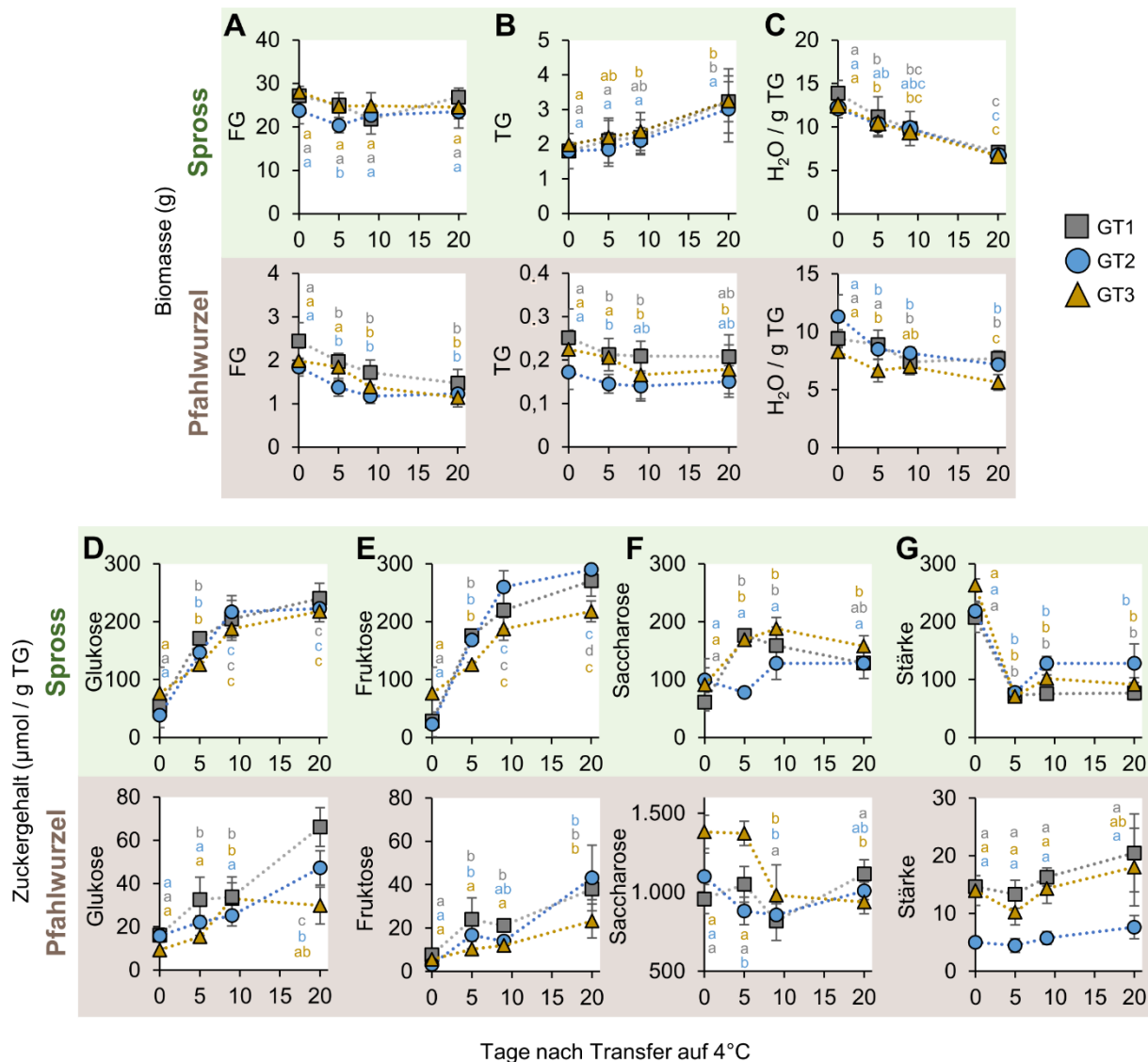


Abbildung 3.1 Biomasse und Zuckergehalte kältebehandelter Zuckerrübenblätter und Pfahlwurzeln.

(A) bis (C) Verhalten von Blättern und Pfahlwurzeln der drei Zuckerrüben genotypen auf kalte Temperaturen. Die Aufzeichnung der Biomasse und der Zuckerakkumulation erfolgte zeitgleich mit der 4 °C-Behandlung. Frischgewicht (FG) (A), Trockengewicht (TG) (B), Wassergehalt ($H_2O/g\ TG$) (C) von Blättern und Wurzeln. (D) bis (G) Gehalt an Glukose (D), Fruktose (E), Saccharose (F) und Stärke (G) in Blättern bzw. Pfahlwurzeln im Verlauf der Kälteperiode (4 °C). Die Datenpunkte zeigen Mittelwerte von $n = 6$ bis 10 Pflanzen $\pm$ SA. Signifikante Änderungen im Vergleich zur Kontrollbedingung (erster Datenpunkt) wurden mittels einfaktoriellem ANOVA mit post-hoc Tukey Test berechnet ($p < 0,05$). Mittelwerte, die keinen Buchstaben gemeinsam haben, sind signifikant unterschiedlich.

Das Zuckerakkumulations-Muster verhielt sich sehr unterschiedlich zwischen Spross und Pfahlwurzel. Die Glukose- und Fruktose-Gehalte stiegen in den Pfahlwurzeln nach der Kälteexposition an, erreichten aber nur 10 bis 20% der gesamten Monosaccharid-Konzentration, die zum gleichen Zeitpunkt in den Blättern beobachtet wurde (Abbildung 3.1D und 1E). Vor der Kälteeinwirkung überstieg der Saccharose-Gehalt der Pfahlwurzeln den der Monosaccharide um das 30- bis 100-fache (Abbildung 3.1F). Der Stärkegehalt der Pfahlwurzeln war bei allen Genotypen extrem gering und veränderte sich während der Kältebehandlung kaum (Abbildung 3.1G). Die drei untersuchten Genotypen wiesen jedoch

eine unterschiedliche Dynamik der Zucker- und Stärkeakkumulation in der Kälte auf: Die Saccharose-Gehalte in den Pfahlwurzeln von GT2 und GT3 nahmen während der Kälteexposition ab, während die von GT1 ziemlich konstant blieben. Interessanterweise wurde der steile Abfall der Saccharose-Konzentration in den Pfahlwurzeln von GT3 (um ~400 mmol/gTG) und in geringerem Maße von GT2 (um ~200 mmol/gTG) nicht von einem proportionalen Anstieg der Monosaccharide begleitet, wie man es für eine ausschließliche Begründung durch eine Saccharose-Hydrolyse erwarten würde. Dieser massive Nettoverlust an Pfahlwurzel-Saccharose deutet darauf hin, dass dieser Zucker entweder (1) vermehrt veratmet, (2) in andere Moleküle als Glukose und Fruktose umgewandelt oder (3) in andere Organe exportiert wurde. In den folgenden Abschnitten wird dargelegt, wie diese drei Möglichkeiten experimentell verifiziert wurden.

3.1.3 Kälteexposition beeinflusst die Photosyntheserate und die CO₂-Assimilation

Kältetolerante Pflanzen wie *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*) reichern als Reaktion auf Kälte Zucker in den Blättern an, halten die photosynthetische Aktivität aufrecht, reduzieren die Saccharose-Phloem-Beladung und erhöhen den Zuckerimport in die Vakuolen der Blattmesophyllzellen (Pommerrenig *et al.*, 2018; Strand *et al.*, 1997; Wingenter *et al.*, 2010). Der Effekt von niedrigen Temperaturen auf die Photosynthese von Zuckerrüben wurde mit drei komplementären Techniken analysiert: Pulsamplituden-modulierte Chlorophyllfluoreszenz Analyse (PAM), CO₂-Assimilation mit Gasaustauschmessungen und Expressionsprofilierung von Photosynthese-assoziierten Genen (Abbildung 3.2).

Die Messungen in Zuckerrüben zeigten, dass Pflanzen die Kälte ausgesetzt waren mit einer Abnahme der photosynthetischen Effizienz reagierten (Abbildung 3.2A und B) und dass die PSII-Quantenausbeute [Y(II)], die Blatt-CO₂-Konzentration, die CO₂-Assimilationsrate und die Blatt-Transpirationsrate von der Umgebungstemperatur abhängig waren. Im Detail zeigten die drei Genotypen eine leichte, aber signifikante Abnahme von Y(II) während der Akklimatisierungsphase (eine Woche bei 12 °C). Parallel dazu stieg das nicht-photochemische Quenching [Y(NPQ)] an und die nicht-regulierte Energiedissipation [Y(NO)] nahm nach der Akklimatisierung an 12 °C ab, ebenfalls bei allen drei Genotypen. Die Tatsache, dass die Y(NPQ)-Quantenausbeute bei 12 °C höher war als bei 20 °C deutet auf einen erhöhten Elektronenfluss in Richtung des Mehler-Ascorbat-Peroxidase-Stoffwechselwegs (Asada, 1999) hin, der für die thermische Energiedissipation an den PSII-Reaktionszentren verantwortlich ist. Nach dem Transfer auf 4 °C nahm Y(II) weiter ab und erholte sich nicht über die analysierte Zeitspanne. Die Abnahme der Y(NPQ)-Quantenausbeute und der gleichzeitige Anstieg der Y(NO)-Quantenausbeute deuteten jedoch darauf hin, dass die Elektronen einer

unregulierten Energiedissipation unterlagen, die bei dieser niedrigen Temperatur freie Radikale erzeugen, was zu Membranschäden führen kann (Abbildung 3.2A).

Messungen des CO₂-Gasaustausches zeigten, dass eine durch PAM-Fluorometrie dokumentierte, reduzierte PSII-Aktivität mit einem drastischen Rückgang der CO₂-Assimilationsrate bei 4 °C, aber nicht bei 12 °C, einherging. Die Transpirationsrate stieg ebenfalls in allen drei Genotypen an, beginnend mit der Akklimatisierung an 12 °C und weitergehend mit einem Transfer auf 4 °C. Diese erhöhte Transpirationsrate deckte sich mit einem kälteabhängigen Anstieg der Blatt-CO₂-Konzentration, was auf eine starke Aktivitäts-Abnahme der Calvin-Zyklus-Enzyme trotz geweiteter Spaltöffnungen hindeutet (Abbildung 3.2B).

Um die umfassenden Strukturen der Genexpression als Reaktion auf Kälte in Zuckerrüben-*Source*- und *Sink*-Gewebe zu bestimmen, wurde ein *deep sequencing* des Transkriptoms (RNA-Seq) unter Verwendung von Blatt- und Pfahlwurzel-Proben für alle drei Genotypen durchgeführt, welche kalten (4 °C) oder Kontrollbedingungen (20 °C) ausgesetzt waren. 14 Tage nach dem Transfer von 12 auf 4 °C, zu einem Zeitpunkt mit maximalem Kontrast zwischen metabolischer Akkumulation von Zuckern (Abbildung 3.1) und Photosyntheserate (Abbildung 3.2A), wurden Proben genommen. Eine Zuordnung der RNA-Seq-Rohdaten auf das Referenzgenom der Zuckerrübe (Dohm *et al.*, 2014) legte dar, dass die Kälteexposition eine globale Umstrukturierung der Genexpression sowohl im Spross- als auch im Pfahlwurzelgewebe induziert (Ergänzende Abbildungen 1 und 2).

Eine Hauptkomponentenanalyse auf Basis extrahierter Transkriptniveaus für Gene, die an der Photosynthese beteiligt sind, lies keine eindeutige Trennung der Genotypen zu (Ergänzende Abbildung 1A). Etwa 9% aller detektieren Transkripte der 20 °C-Proben konnten *Gene Ontology*-Termen zugeordnet werden, die an der Photosynthese beteiligt sind, insbesondere den Untergruppen "Photosynthese.Lichtreaktion", "Photosynthese.Calvin-Zyklus" und "Photosynthese.Photorespiration". Nach der 4 °C-Exposition war diese Gruppe nur noch mit 3% aller Reads vertreten, was auf eine drastische kälteabhängige Herabregulierung Photosynthese-bezogener Gene hinweist (Abbildung 3.2C). So konnte beispielsweise eine starke Herunterregulierung der Transkriptlevel von Genen welche für die Rubisco-Aktivase (*RCA*), Rubisco small subunit (*RBCS*), ein Chlorophyll a/b bindendes Protein (*CAB*) und Plastocyanin (*PC*) kodieren, beobachtet werden (Abbildung 3.2D).

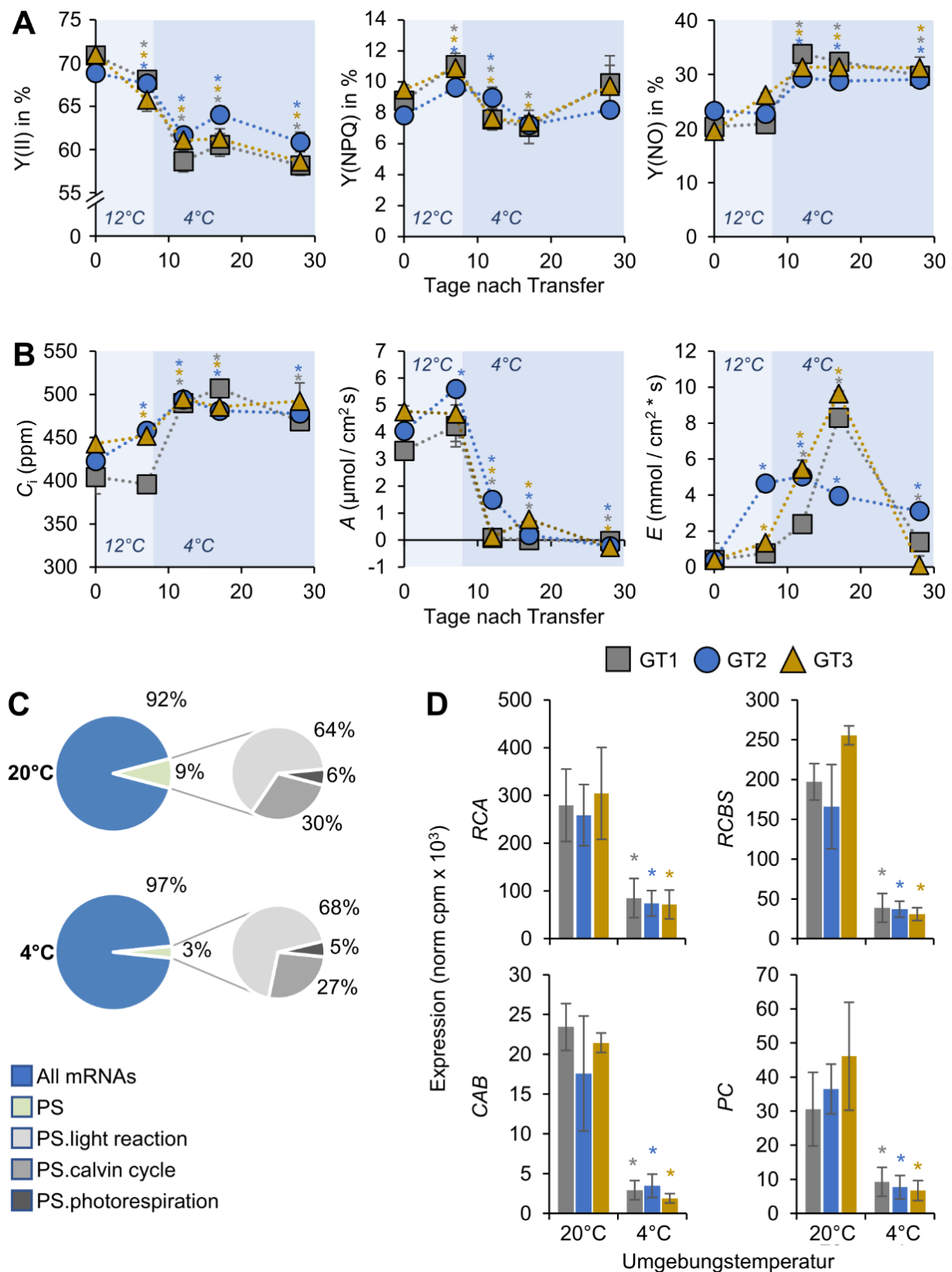


Abbildung 3.2 Photosynthetische Parameter, CO_2 -Assimilation und Expressionsdaten in Zuckerrübenblättern nach Kälteeexposition.

(A) PAM-Messungen an Blättern drei verschiedener Genotypen. Photosynthetische Quantenausbeute $[Y(II)]$, nicht-photochemisches Quenching $[Y(NPQ)]$ und nicht-reguliertes Quenching $[Y(NO)]$. (B) Gasaustausch-Messungen. Dargestellt sind die interzelluläre Blatt- CO_2 -Konzentration (C_i), die CO_2 -Assimilationsrate (A) und die Transpirationsrate (E). Datenpunkte in (A) und (B) zeigen Mittelwerte von vier unabhängigen Pflanzen, die über den gesamten Zeitraum verwendet wurden. Temperaturintervalle

sind hellblau (12 °C) oder blau (4 °C) hinterlegt. Sternchen kennzeichnen signifikante Veränderungen zur 20 °C-Bedingung (0 Tage nach dem Transfer) gemäß Student's *t*-Test ($p \leq 0,05$). **(C)** Prozentsatz der RNA-Seq-Reads, die als Gene annotiert sind, welche für Photosynthese (PS)-assoziierte Proteine kodieren. Die Tortendiagramme zeigen gemittelte Mittelwerte drei verschiedener Genotypen bei 20 °C (Kontrolle) und nach 14 Tagen bei 4 °C. **(D)** Expression der Zuckerrüben RCA, RBCS, CAB und PC. Die Daten repräsentieren mittlere normalisierte cpm-Werte von drei unabhängigen RNA-Seq Analysen pro Genotyp und Temperaturbedingung $\pm$ SA. Signifikante Änderungen relativ zur Kontrollbedingung (20 °C) wurden mittels Student's *t*-Test berechnet (* $p < 0,05$).

Zusammenfassend zeigten die Daten, dass die Photosynthese bei Zuckerrüben sehr empfindlich auf Temperaturen unter 12 °C reagiert. Die Ergebnisse deuten des Weiteren darauf hin, dass der Anstieg der Biomasse und des Zuckers in den Blättern von kältebehandelten Zuckerrüben nicht durch die CO₂-Assimilationsraten erklärt werden kann, da diese bei 4 °C vernachlässigbar sind (Abbildung 3.1 und Abbildung 3.2).

3.1.4 Kalte Temperaturen verändern den Hauptkohlenhydratstoffwechsel in Spross und Pfahlwurzel

Als nächstes wurde untersucht, ob die niedrigen Saccharose-Konzentrationen in der Pfahlwurzel bei Kälte auf eine erhöhte Atmung zurückzuführen sein könnten. Es wurde auch überprüft, ob kalte Temperaturen die Transkription von Genen verändern die für Enzyme des Hauptkohlenhydratstoffwechsels kodieren (Abbildung 3.3). Die Atmung in den Pfahlwurzeln spiegelte die relative Position (Tiefe) wider, in der die Pfahlwurzel im Boden vergraben war, da sie zwischen den oberen und unteren Teilen allmählich abnahm. Das gleiche Muster konnte bei 4 °C beobachtet werden, obwohl die Respirationsraten generell niedriger waren als die bei 20 °C gemessenen (Abbildung 3.3B). Die Kohlenhydrate der Pfahlwurzel liefern also sowohl bei 4 °C als auch bei 20 °C Energie für den glykolytischen und oxidativen Katabolismus, aber die Kälteexposition führte zu einem 50- bis 60-prozentigen Rückgang der Atmung, im Vergleich zu der bei 20 °C beobachteten. Im Gegensatz dazu stieg die Nettoatmung in *Source*-Blättern aller Genotypen in der Kälte an (Abbildung 3.3A), was darauf hindeutet, dass voll entwickelte Blätter aufgrund eines Verlustes der CO₂-Assimilationskapazität aus der Photosynthese (Abbildung 3.2) eine hohe Kohlenhydratzufuhr aus einer anderen Quelle benötigten. Eine solche Quelle ist wahrscheinlich Stärke, die in Blättern in der Kälte abnahm (Abbildung 3.1G).

Um den zellulären Energiezustand der Blätter sowie der Pfahlwurzeln zu bestimmen, wurde der Adenylatspiegel gemessen (Abbildung 3.3 C). Der ATP-Spiegel, das ATP/ADP-Verhältnis und die Energieladung ($[ATP] + 0,5 [ADP]/[ATP] + [ADP] + [AMP]$) stiegen im Spross aller Genotypen an. Diese erhöhte Energetisierung des Sprossgewebes in der Kälte könnte auf den drastischen Rückgang der ATP-verbrauchenden CO₂-Assimilation (Abbildung 3.2B) und den parallelen Anstieg der Atmung der Blätter (Abbildung 3.3B) zurückzuführen sein. Im Gegensatz dazu änderte sich die Energetisierung in den Pfahlwurzeln in der Kälte nicht.

Obwohl der ATP-Gehalt ebenfalls anstieg, blieb das ATP/ADP-Verhältnis der GT1- und GT2-Pfahlwurzeln tatsächlich konstant, während es bei GT3 abnahm. Außerdem verringerten sich die Energieladungswerte der Pfahlwurzeln leicht in GT2- und GT3-Pfahlwurzeln, aber nicht in GT1-Pfahlwurzeln, nach dem Transfer auf 4 °C (Abbildung 3.3C).

Eine Hauptkomponentenanalyse, bei der die Transkriptionswerte von Genen, die dem *Gene Ontology*-Term "Haupt-CHO-Stoffwechsel" annotiert sind als Input verwendet wurden, zeigte organ- und temperaturabhängige Unterschiede (Ergänzende Abbildung 1B). Wie in der *Heatmap* in Abbildung 3.3D visualisiert, wurden Gene die für Stärke-abbauende Enzyme kodieren im Spross durch die Kälteexposition hochreguliert, während diejenigen die an der Stärkebiosynthese beteiligt sind, herunterreguliert wurden (Abbildung 3.3D). Obwohl die Pfahlwurzeln sehr geringe Stärkegehalte aufweisen (Abbildung 3.1G), wurden Stärke-bezogene Gene auch in den Pfahlwurzeln in der gleichen Weise reguliert wie in den Blättern (Abbildung 3.3D). Diese Beobachtung stimmt mit einem Bericht von Turesson *et al.* (2014) überein, welche die Aktivität von Enzymen des Stärkestoffwechsels in Pfahlwurzeln nachweisen konnten, obwohl die Pfahlwurzeln keine Stärke enthalten. Gene, die für Saccharose-biosynthetische Enzyme kodieren wurden in Wurzeln in der Kälte hochreguliert, blieben aber in Blättern unverändert. Die Transkriptniveaus für Gene die für Saccharose-abbauende Enzyme kodieren, wurden jedoch in Wurzeln deutlich herunter und in Blättern leicht hochreguliert (Abbildung 3.3D).

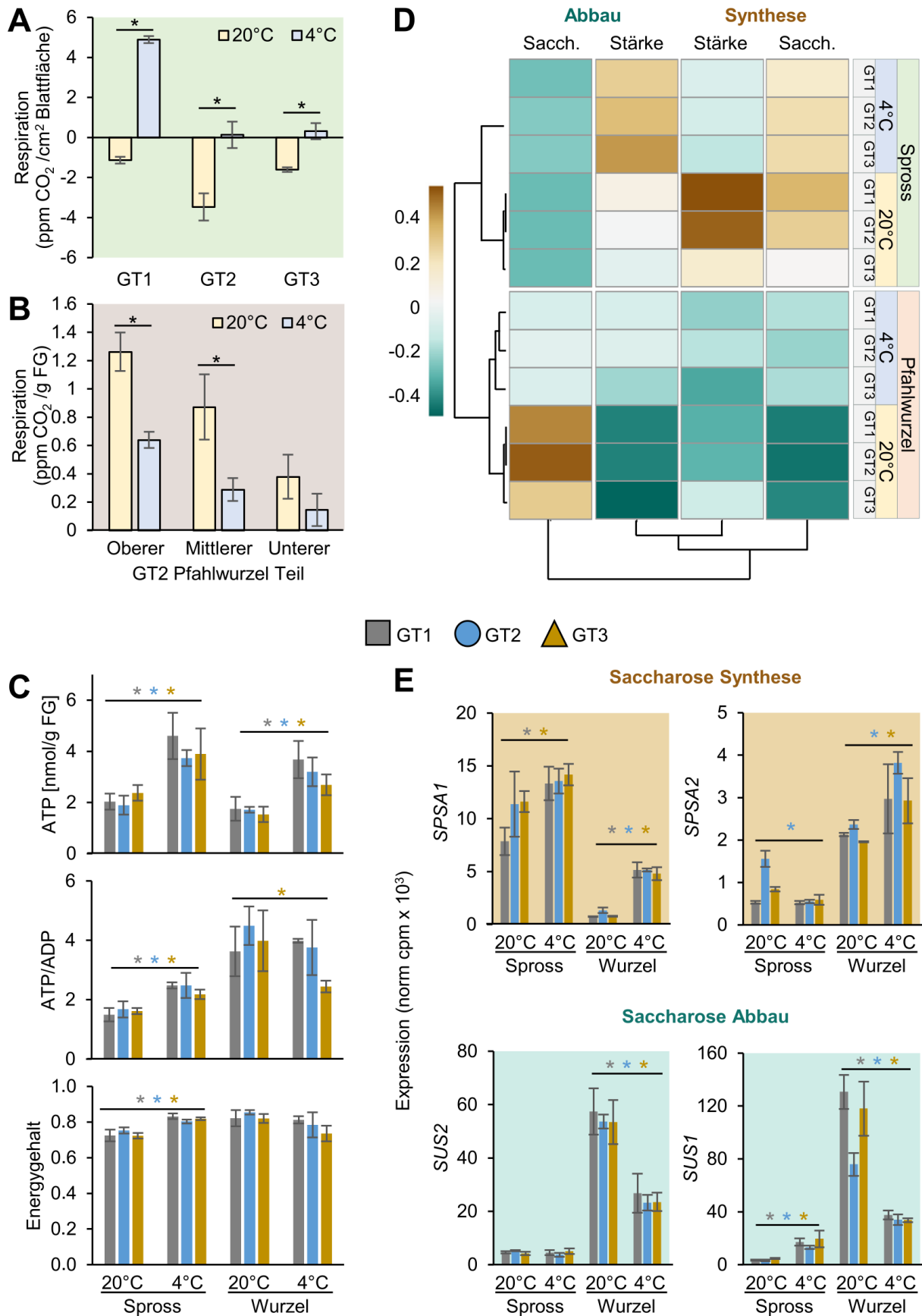


Abbildung 3.3 Veränderungen des Hauptkohlenhydratstoffwechsels und des Energiezustandes als Reaktion auf Kälteeinwirkung.

(A) Respiration (CO₂-Produktion) von Blattgewebe dreier Zuckerrüben-Genotypen unter Kontrollbedingungen (20 °C, gelb) oder eine Woche nach Transfer auf 4 °C (blau). (B) Atmung (CO₂-

Produktion) von verschiedenen Pfahlwurzelregionen von GT2 unter Kontrollbedingungen (20 °C, gelb) oder eine Woche nach Transfer zu 4 °C (blau).

(C) ATP, ATP/ADP-Verhältnis, Energiegehalt ($[ATP] + 0,5 [ADP]/[ATP] + [ADP] + [AMP]$).

(D) Heat-Map-Analyse gruppierter Expressionswerte, welche aus dem RNA-Seq-Datensatz extrahiert wurde. Eine unit variance Skalierung wurde auf Zeilen angewandt. Diese verwenden die Manhattan-Distanz- und Average Linkage-Methode.

(E) Expression von zwei Zuckerrüben-SPS-Genen (*SPSA1* und *SPSA2*) und zwei SUS-Genen (*SUS1* und *SUS2*), extrahiert aus dem RNA-Seq-Datensatz.

Für (A), (B), (C) und (E) sind die Datenpunkte aus Mittelwerten von mindestens vier Einzelpflanzen $\pm$ SA für (A) und (B) bzw. von drei Pools bestehend aus jeweils vier Pflanzen für (C) und (E). Sternchen repräsentieren p -Werte $< 0,05$ unter Verwendung eines t -Tests im Vergleich zu den Werten unter Kontrollbedingungen (20 °C).

Die Saccharose-Phosphat-Synthase (SPS) und die Saccharose-Synthase (SUS) sind zwei Schlüsselenzyme die an der Saccharose-Biosynthese bzw. dem Saccharose-Abbau beteiligt sind. Ihre Aktivität diktiert die Identitäten von *Source*- und *Sink*-Gewebe mit, da die Identität des *Source*-Gewebes mit einer hohen SPS-Aktivität assoziiert ist, während *Sink*-Gewebe in der Regel eine hohe SUS-Aktivität besitzen (Kovtun und Daie, 1995; Martin *et al.*, 1993; Ruan, 2014; Sturm, 1996). Es wurde demnach eine genomweite Suche nach *SPS*- und *SUS*-Genen im Zuckerrübengenom (RefBeet 1.2; Dohm *et al.*, 2014) durchgeführt, welche zur Identifizierung von *SPS*- sowie vier *SUS*-Kandidaten führte. Basierend auf der Bayes'schen Analyse gehören beide *SPS*-Kandidaten zur *SPS A*-Untergruppe (Volkert *et al.*, 2014) und wurden daher als *SPSA1* und *SPS A2* bezeichnet (Ergänzende Abbildung 3A). Unter Kontrollbedingungen war das Expressionsniveau von *SPSA1* in den Sprossen aller Genotypen im Vergleich zu den Wurzeln ~ 10 -fach höher. Nach der Kälteexposition stiegen die *SPSA1*-Transkriptspiegel in den Wurzeln um das bis zu Siebenfache an, blieben in den Blättern jedoch konstant. Unter Kontrollbedingungen zeigte *SPSA2* ein entgegengesetztes Expressionsmuster: niedrig in Blättern, aber hoch in Wurzeln aller getesteten Genotypen, in Übereinstimmung mit einem früheren Bericht (Hesse *et al.*, 1995), der dieses Gen als pfahlwurzelspezifisch, Glukose-induziert und Saccharose-reprimiert beschrieb. Die *SPSA2*-Expression war entweder unverändert in GT1- und GT3-Sprossen, oder nach Kältebehandlung herunterreguliert in GT2-Blättern. Genau wie *SPSA1* wurde *SPSA2* jedoch in den Pfahlwurzeln aller Genotypen induziert.

Mittels Massenspektrometrie wurde die „lösliche Proteinlandschaft“ des bereits für die Transkriptomanalyse beprobten Pfahlwurzelgewebes aufgedeckt: *SPSA1*, nicht aber *SPSA2*, war nach Kältebehandlung etwas häufiger vorhanden (Ergänzende Abbildung 3B). Ebenso konnte bei 4 °C eine höhere SPS-Aktivität im Vergleich zu 20 °C in den Proteinextrakten der Pfahlwurzel festgestellt werden (Ergänzende Abbildung 3C). Zusammengefasst führten niedrige Temperaturen zu höheren UDP-Spiegeln in den Pfahlwurzeln, zu höheren Saccharose-6-Phosphat-Spiegeln und erhöhten Spiegeln des allosterischen SPS-Aktivators Glucose-6-Phosphat (Huber und Huber, 1992). Diese Beobachtungen stützen die Annahme,

dass eine erhöhte SPS-Aktivität die metabolische Ausrichtung der Pfahlwurzel auf die Saccharose-Synthese fördert (Ergänzende Abbildung 4).

Das Expressionsmuster der vier *SUS*-Kandidaten unterliegt gewebe- und temperaturspezifischen Anpassungen. Während die *SUS1*- und *SUS2*-Genexpression und die Abundanz der dadurch kodierten Proteine in Wurzeln stark zunahm, wurden *SUS3* und *SUS4* kaum exprimiert und die korrespondierenden Proteine nicht nachgewiesen (Abbildung 3.3E; Ergänzende Abbildung 5). Die *SUS1*- und *SUS2*-Transkriptspiegel waren in Pfahlwurzeln 10- (*SUS1*) bis 100- (*SUS2*) höher als im Spross-Gewebe, was ihre Rolle als *Sink*-bestimmende Faktoren belegt. Nach Kälteeinwirkung sanken die mRNA-Gehalte für *SUS1* und *SUS2* in den Pfahlwurzeln um etwa 50%. Im Gegensatz dazu stiegen die *SUS2*-Transkriptspiegel um das 10- bis 20-fache an, wobei diese nie die in der Pfahlwurzel beobachteten Höchstwerte erreichten (Abbildung 3.3E). Die *SUS2*-Konzentrationen folgten weitgehend den *SUS2*-mRNA-Gehalten in den Pfahlwurzeln, während die *SUS1*-Konzentration konstant blieb, was auf einen differentiellen Proteinumsatz dieser beiden Isoformen als Reaktion auf die Kältebehandlung schließen lässt (Ergänzende Abbildungen 5B und 5C).

Zusammengenommen deuten diese Daten darauf hin, dass sich entwickelnde Pfahlwurzeln auf Kälte reagieren, indem sie sich von einem Saccharose-verbrauchenden/speichernden Organ zu einem Saccharose-synthetisierenden Gewebe verändern, während das Blattgewebe einige der Eigenschaften eines *Sink*-Gewebes annimmt.

3.1.5 Kalte Temperaturen bewirken eine Umkehrung der Phloem-Translokation von Saccharose und seinem fluoreszierenden Analog Esculin

Die bisherigen Erkenntnisse deuten darauf hin, dass Veränderungen in der CO₂-Assimilation oder im Stärkeabbau die kälteinduzierte Zuckerakkumulation in den Sprossen nicht vollständig erklären können. Sie stützen daher die Hypothese, dass der für Blattmetabolite genutzte Kohlenstoff möglicherweise aus den Speicherzellen der Pfahlwurzel remobilisiert wird. Um den Verbleib des Kohlenstoffs in der Pfahlwurzel nach Kälteexposition zu verfolgen, wurde radioaktiv markierte ¹⁴C-Saccharose in das parenchymatische Pfahlwurzelgewebe von Pflanzen die entweder unter 20 °C-Kontrollbedingungen oder Kälteexposition (5 Tage bei 12 °C und dann 7 Tage bei 4 °C) kultiviert waren injiziert. Nach einer weiteren Woche unter Kontroll- oder Kältebedingungen wurden Blätter und die Pfahlwurzel der Pflanzen einzeln präpariert. Blätter oder dünne Längsschnitte von Pfahlwurzeln wurden unter Druck getrocknet, um anschließend die in den Präparaten vorhandene Radioaktivität mittels Phosphorimaging-Platten sichtbar zu machen (Abbildung 3.4; Ergänzende Abbildungen 6 und 7).

Überraschenderweise, akkumulierten kältebehandelte Pflanzen Radioaktivität in den Blättern, besonders in den Blattadern und mit abnehmender Intensität in Richtung der Blattspitze, was

mit der Phloemtransport-Richtung übereinstimmt (Abbildung 3.4B). *Source*-Blätter von unter Kontrollbedingung angezogenen Pflanzen weisen nur eine sehr geringe Radioaktivität auf (Abbildung 3.4C), obwohl diese in den Blattstielen junger *Sink*-Blätter der gleichen Pflanzen nachgewiesen werden konnte (Abbildung 3.4D). Dieses radioaktive Signal könnte den Transport von Saccharose oder Derivaten durch das Xylem repräsentieren, verursacht durch die Verletzung der punktierten Gefäße durch das invasive applizieren der radioaktiv markierten Saccharose.

Der drastische Wasserverlust der Blätter bei 4 °C (Abbildung 3.1C) spricht jedoch gegen einen Saccharose-Transport über das Xylem zu den Blättern und stattdessen für einen Transport über das Phloem zu den Blättern, die von *Source*- zu *Sink*-Organen gewechselt sind. Um diese Hypothese zu testen, wurde eine weniger invasive Strategie verfolgt, die den Transport von Assimilaten (einschließlich des vorherigen Abwärtstransports) ggf. realistischer widerspiegelt. Dazu wurde ein fluoreszierendes, phloem-mobiles Cumarin-Glykosid namens Esculin (Knoblauch *et al.*, 2015) verwendet, welches von mehreren Saccharose-Transportern, darunter der Zuckerrüben-Phloem-Belader **SUCROSE TRANSPORTER 1 (SUT1)**, als Substrat akzeptiert wird (Nieberl *et al.*, 2017). Hierzu wurde ein *Source*-Blatt mit Esculin infiltriert und der Transportweg durch Fluoreszenz-Aufnahmen von Dünnschnitten der Petiolen unbeladener *Source*-Blätter bestimmt. Diese Blätter stammten von Pflanzen die entweder unter Kälte- oder Kontrollbedingungen kultiviert wurden (Abbildung 3.4E). Eine Esculin-Fluoreszenz konnte lediglich in kältebehandelten Pflanzen, insbesondere in deren Phloem-Gefäßbündeln, detektiert werden. Diese Fluoreszenz war jedoch nicht auf das Phloem beschränkt, da auch Fluoreszenz in einer Bündelregion detektiert werden konnte, die mit der für verholzte Xylemgefäße charakteristischen gelben Fluoreszenz markiert war (Abbildung 3.4H bis K). In den bei 20 °C gewachsenen Kontrollpflanzen konnte keine Esculin-Fluoreszenz im Phloem nachgewiesen werden (Abbildung 3.4F und G). Esculin wird wahrscheinlich zunächst an die Basis des inokulierten Blattes und sodann durch (zumindest) Teile der Pfahlwurzel transloziert, bevor es zu weiteren Blättern migriert.

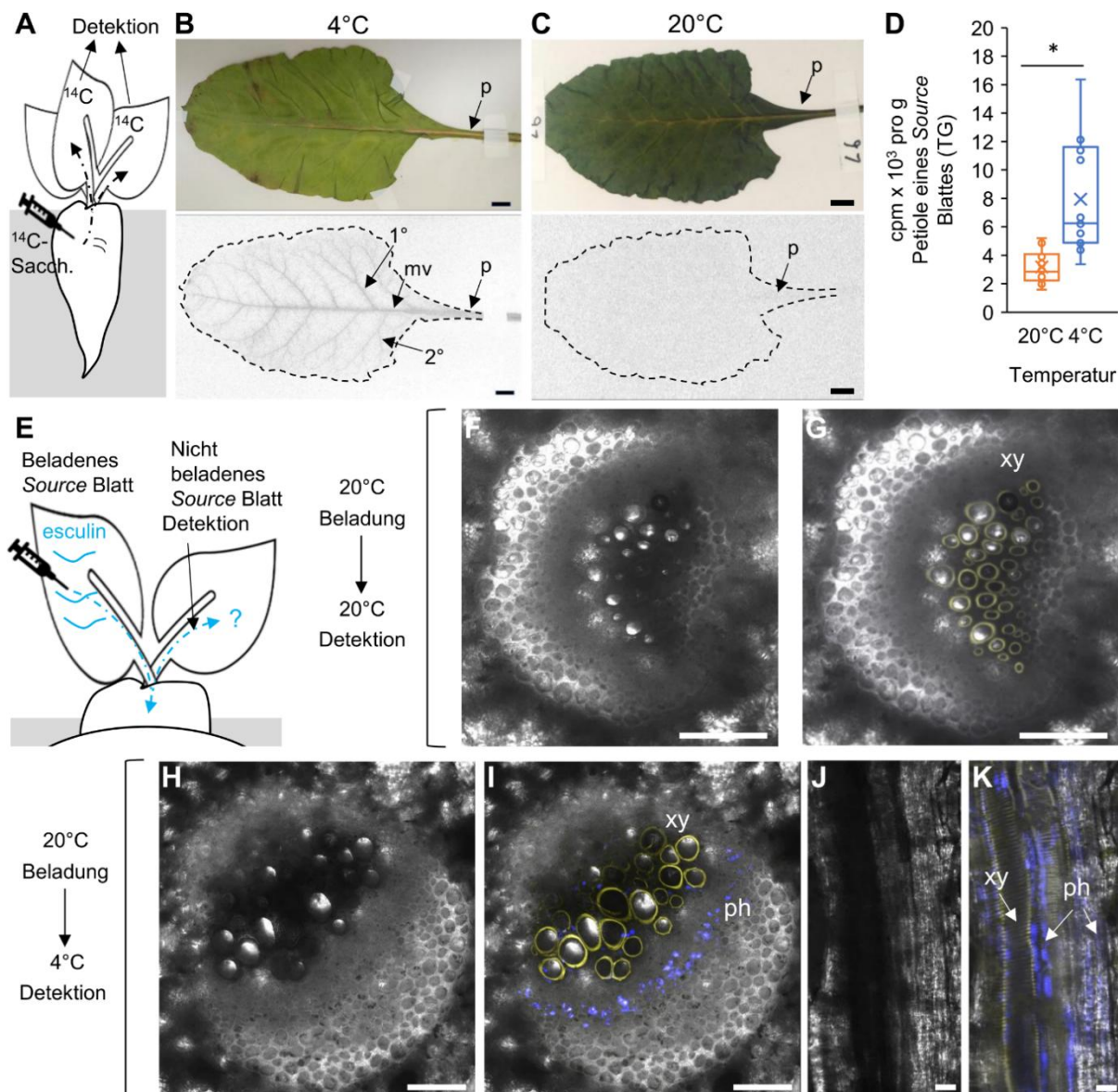


Abbildung 3.4 Verteilung von ^{14}C -Saccharose und Esculin in Blättern.

(A) bis (D) Autoradiographie von ^{14}C -Saccharose in Blättern.

(A) Schematische Darstellung des Experiments: Ein *Source*-Blatt einer repräsentativen Pflanze, welche eine Woche bei 4 °C gewachsen ist.

(B) Die Schwärzung der Adern zeigt die in das Blattgewebe aufgenommene und verteilte Radioaktivität nach der Injektion von radioaktiv markierter Saccharose in die Pfahlwurzeln. mv, mittlere Blattrippe; p, Petiole; 1° = Seitenader erster Ordnung; 2° = Seitenader zweiter Ordnung.

(C) *Source*-Blatt einer repräsentativen Kontrollpflanze, gewachsen bei 20 °C.

(D) Die Radioaktivität in cpm wurde in isolierten Blattstielen von Pflanzen gemessen, die entweder bei 4 oder 20 °C gewachsen sind. Die Mittellinien zeigen die Mediane; die Kästchengrenzen geben die 25. und 75. Perzentile an; die Whisker erstrecken sich über das 1,5-fache des Interquartilsbereichs der 25. und 75. Perzentile; Ausreißer werden durch Punkte dargestellt; die Kreuze stellen die Mittelwerte der Proben dar; n = 16 Probenpunkte. Das Sternchen zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen den 20 °C- und 4 °C-Behandlungen unter Verwendung eines *t*-Tests an (* $p \leq 0,05$). TG, Trockengewicht.

(E) bis (K) Esculin-Beladungen. Gelbe Fluoreszenz kennzeichnet verholzte Xylemgefäße; blaue Fluoreszenz kennzeichnet den Esculin-Transport.

(E) Schematische Darstellung des Experiments.

(F) und (G) Schnitte durch Petiolen unbeladener *Source*-Blätter. Querschnitte durch 20 °C-behandelte Petiolen sind als Hellfeldbild (F) und ein UV-Licht-Fluoreszenzbild (G) dargestellt.

(H) und (I) Querschnitte durch Petiolen aus 4 °C sind als Hellfeldbilde (H) und als UV-Licht-Fluoreszenzbild (I). ph, phloem; xy, xylem.

(J) und (K) Längsschnitte durch 4 °C-behandelte Petiolen sind als Hellfeldbilde (J) und als UV-Licht-Fluoreszenzbild (K) dargestellt. Balken = 1 cm in (B) und (C), 100 µm in (F) bis (K).

Um den Saccharose-Fluss von der Inokulationsstelle in die Pfahlwurzeln zu verfolgen, wurden dünne Längsschnitte der inokulierten Pfahlwurzeln auf Phosphorimaging-Platten exponiert (Abbildung 3.4A; Ergänzende Abbildungen 6 und 7). In 4 °C-exponierten Pfahlwurzeln wurde eine hohe Radioaktivität in geäderten oder punktförmigen Strukturen zwischen der Inokulationsstelle und dem oberen Pfahlwurzelbereich (Kronengewebe) nachgewiesen. Bei stärkerer Vergrößerung konnten diese Strukturen als Leitbündel identifiziert werden (Ergänzende Abbildung 6). In Pfahlwurzeln von Kontroll-Pflanzen wurde kein radioaktives Signal das für vaskulären Strukturen spricht beobachtet. Allerdings reicherte das Kronengewebe etwas Radioaktivität an, was indikativ für den Transport von radioaktiv markierter Saccharose aufwärts in Richtung des Sprosses ist (Ergänzende Abbildung 7). In den meisten Fällen war die in den Pfahlwurzeln von 20 °C-behandelten Pflanzen nachgewiesene Radioaktivität jedoch lediglich auf parenchymatische Regionen in der Nähe der Inokulationsstelle beschränkt oder in markanten Strängen konzentriert, die von der Inokulationsstelle in Richtung der Entstehung von Seitenwurzeln reichten.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass radioaktiv markierte Saccharose und Esculin in der Kälte, nicht aber unter Kontrollbedingungen, bevorzugt von den Pfahlwurzeln in die Blätter transportiert wurden, und zwar auf dem gleichen Transportweg wie die aus dem parenchymatischen Speichergewebe freigesetzte Saccharose.

3.1.6 Vakuoläre Saccharose-Importer und -Exporter-Gene sowie -Proteine zeigen kälteabhängig entgegengesetzte Expression

Als nächstes wurde analysiert, ob der kältebedingte Saccharose-Transport zwischen Pfahlwurzeln und Blättern möglicherweise durch eine gegenläufige Aktivität vakuolärer Saccharose-Importer und -Exporter vermittelt wird. In Arabidopsis wird der vakuoläre Saccharose-Import bzw. Export durch **TONOPLAST SUGAR Transporter (TSTs)** und **SUCROSE TRANSPORTER 4 (SUT4)** vermittelt (Schneider *et al.*, 2012; Schulz *et al.*, 2011; Wormit *et al.*, 2006). Der Zuckerrüben TST2;1, das putative Homolog des Arabidopsis TST1, ist für die vakuoläre Saccharose-Akkumulation verantwortlich (Jung *et al.*, 2015). Die Expression von TST2;1 in den Pfahlwurzeln aller getesteten Genotypen überstieg bei weitem die Expression im Blattgewebe, was dessen Rolle als Saccharose-Belader der Pfahlwurzel-Parenchym-Vakuolen stützt (Abbildung 3.5A und B). Interessanterweise nahmen sowohl die TST2;1 mRNA- als auch die Proteinhäufigkeit in den Pfahlwurzeln aller Genotypen nach der Kältebehandlung signifikant ab (Abbildung 3.5B; Ergänzende Abbildung 8).

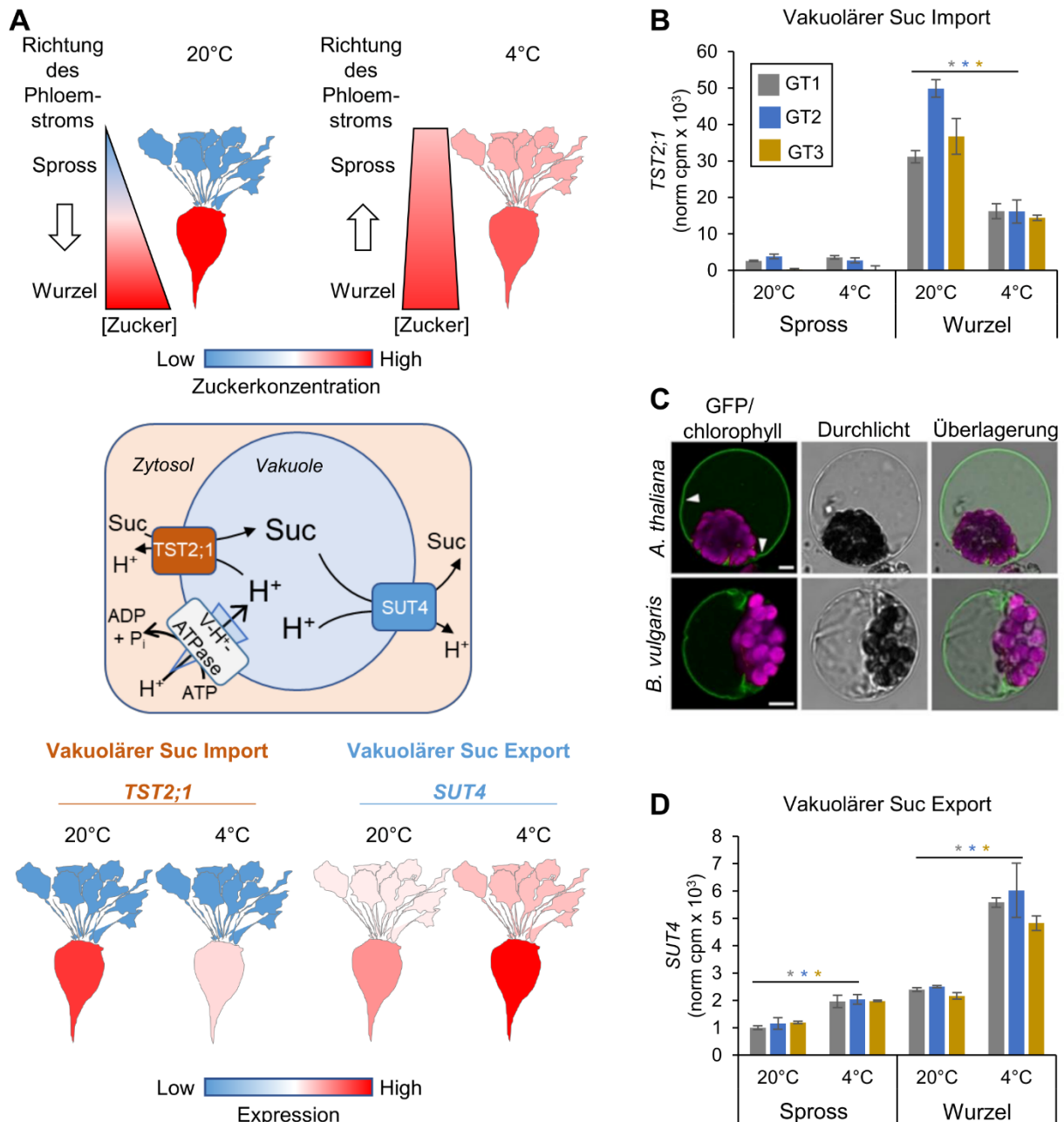


Abbildung 3.5 Kälteabhängige Akkumulation von *TST2;1* und *SUT4* in drei verschiedenen Zuckerrüben-Genotypen.

(A) Illustration kälteinduzierter Prozesse. Das obere Bild zeigt die kälteabhängige Zuckerumverteilung von der Pfahlwurzel zum Spross. Das mittlere Bild zeigt eine schematische Darstellung der vakuolären Transportprozesse und -faktoren in der Pfahlwurzel. Eine vakuoläre ATPase (V-H1-ATPase) stellt eine protonenmotorische Kraft über den Tonoplasten her; *TST2;1* agiert als Protonen-/Saccharose-Antiporter und nutzt die protonenmotorische Kraft, um den Saccharose-Import in die Vakuolen anzutreiben. *SUT4* agiert als Protonen-/Saccharose-Symporter und nutzt die protonenmotorische Kraft für den vakuolären Saccharose-Export. Das untere Bild zeigt die reziproke kälteinduzierte Regulation der *TST2;1*- und *SUT4*-mRNA-Spiegel in Pfahlwurzeln.

(B) Transkriptabundanz von *TST2;1* basierend auf RNA-Seq-Reads.

(C) Subzelluläre Lokalisation von *SUT4*-GFP in Blattmesophyll-Protoplasten von Arabidopsis oder Zuckerrüben. In allen Bildern sind einzelne optische Schnitte dargestellt. Grüne Farbe, GFP-Signal; violette Farbe, Chlorophyll-Autofluoreszenz. Pfeilspitzen zeigen auf die Vakuolenmembran (Tonoplast). Balken = 5 µm.

(D) Transkriptabundanz von *SUT4* basierend auf RNA-Seq-Reads.

Die Werte in (B) und (D) stellen Mittelwerte aus $n = 3$ biologischen Replikaten $\pm$ SA dar. Sternchen kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungen bei 20 und 4 °C unter Verwendung eines t -Tests (* $p < 0,05$).

Der Saccharose-Export aus der Vakuole wird vermutlich durch einen Transporter vom Typ SUT4 vermittelt. Identifiziert wurde Bv5_124860_zpft.t1 als ein putatives Zuckerrüben-Homolog vom Arabidopsis SUT4 (*AtSUT4*). Demnach wurde der entsprechende Transporter *BvSUT4* genannt (Ergänzende Abbildung 9). Die transiente Expression einer N-terminalen Fusion der kodierenden *BvSUT4*-Sequenz an GFP in Zuckerrüben- oder Arabidopsis-Mesophyll-Protoplasten zeigte eine eindeutige Tonoplasten-Lokalisation für *BvSUT4* (Abbildung 3.5Abbildung 3.4C). Basierend auf den RNA-Seq-Daten stiegen die *BvSUT4*-Transkriptspiegel in Pfahlwurzeln in der Kälte signifikant an (Abbildung 3.5D). Diese Ergebnisse zeigen, dass der vakuoläre Pfahlwurzel-Saccharose-Import unter Kältebedingungen abnimmt, während die Freisetzung von vakuolärer Pfahlwurzel-Saccharose zunimmt. Diese Beobachtungen stützen die Hypothese, dass die gegensätzliche Regulation von *BvTST2;1* und *BvSUT4* in Pfahlwurzeln die zugrundeliegende treibende Kraft für die Akkumulation und Abgabe von Zuckern an das darüberliegende Blattgewebe ist.

3.1.7 Die Expression von Blütenregulator-Genen ist kältere reguliert

Die beobachtete Translokation von Saccharose aus den Pfahlwurzeln zurück in die Blätter, welche diese zunächst produziert haben, könnte eine metabolische Vorbereitung auf den Beginn der Blüte darstellen. Demnach wurde die Expression von Blütenregulator-Genen im vorhandenen RNA-Seq-Datensatz überprüft und, übereinstimmend mit vorigen Berichten (Pin *et al.*, 2012), eine Herabregulierung des Zuckerrüben-Blütenrepressors *Flowering Locus 1 (FT1)* und eine Hochregulierung des Blütenaktivators *FT2* in Blättern von kältebehandelten Pflanzen beobachtet (Abbildung 3.6). Alle hier analysierten Genotypen haben eine zweijährige Wuchs-Habitus und tragen als solche nicht-funktionale Allele von *Bolting Time Control 1 (BTC1)* und *B-box-containing protein 19 (BBX19)*, die die *FT1*-Expression nicht beeinflussen. Dennoch reagierte die *BTC1*- und *BBX19*-Expression auf Kältebehandlung in entgegengesetzter Weise. Die *BTC1*-Transkriptspiegel nahmen in der Kälte sowohl in den Wurzeln als auch in den Sprossen ab, während die *BBX19*-Transkriptspiegel anstiegen. Diese Beobachtung steht in scharfem Kontrast zu den Ergebnissen von Pin *et al.* (2012), die zeigten, dass vernalisierte zweijährige Zuckerrüben höhere *BTC1* mRNA-Spiegel im Vergleich zu nicht vernalisierten Pflanzen aufwiesen. Vermutlich ist die vermeintliche Diskrepanz zu den hierin präsentierten Ergebnissen darauf zurückzuführen, dass die Expressionsprofile nach der Vernalisation (Pin *et al.*, 2012) und nicht wie in der vorliegenden Arbeit in den frühen Stadien der Vernalisation erstellt wurden. Unter den vorliegenden Bedingungen konnte die Expression von *BTC1* und *BBX19* sowohl in Blättern als auch in Pfahlwurzeln nachgewiesen werden, wobei die *BBX19*-Transkriptspiegel in kältebehandelten Pfahlwurzeln diejenigen in 20 °C-behandelten Blättern um fast das Dreifache übertrafen. Allerdings wurden die Gene von *FT1* und *FT2*, die potenzielle

Zielpoteine der funktionellen BCT1 und BBX19 einjähriger Rüben darstellen, spezifisch und ausschließlich in Blättern exprimiert (Abbildung 3.6).

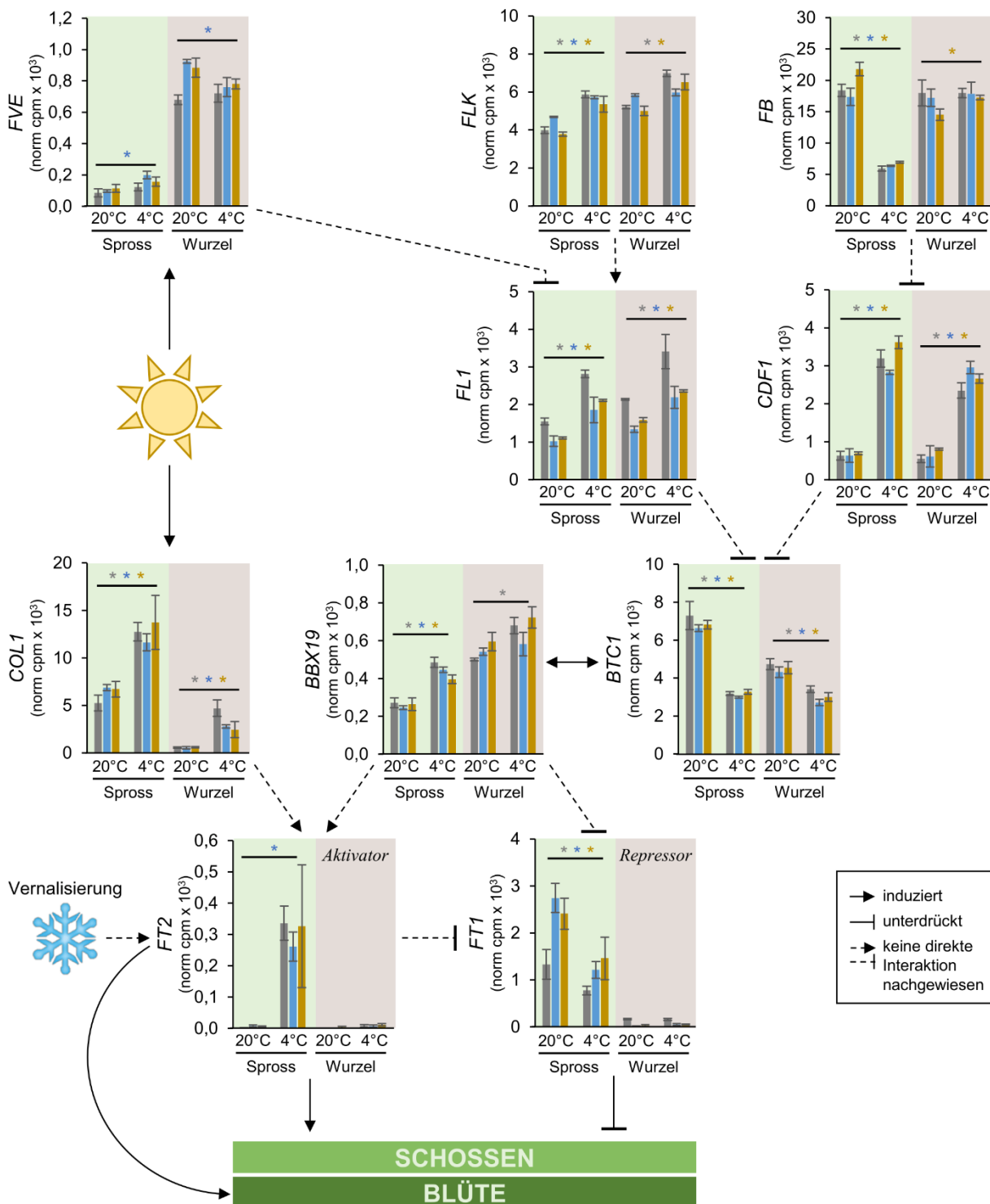


Abbildung 3.6 Expression von Blütenregulator-Genen

Transkriptabundanz von Zuckerrüben FVE, FLK, FB, FL1, CDF1, COL1, BBX19, BTC1, FT1 und FT2 basierend auf RNA-Seq-Reads in Blättern und Pfahlwurzeln drei verschiedener Genotypen. Die Werte stellen Mittelwerte aus $n = 3$ biologischen Replikaten $\pm$ SA dar. Sternchen kennzeichnen p -Werte $< 0,05$ unter Verwendung eines t -Tests.

Die BTC1-vorgeschalteten Blüh-Faktoren sind ebenfalls entsprechend reguliert. Demnach sind sowohl der *FL1*- als auch der *Cycling Dof Factor 1* (*CDF1*)-Transkriptgehalt, beides

Repressoren von *BTC1* (Dally *et al.*, 2014; Goraloglia *et al.*, 2017; Pin *et al.*, 2012), bei Kälte in allen Genotypen und Geweben hochreguliert. Die stärkere Regulation ist mit einer 3- bis 5-fachen Erhöhung bei *CDF1* zu beobachten, die, zumindest im Blattgewebe, durch die weniger starke Expression des CDF1-Repressor-Gens *F-box protein (FB)* bei Kälte bedingt sein könnte. Im Gegensatz dazu ist die leichte Abundanz-Erhöhung des *FL1*-Transkriptgehalts vorwiegend auf die hochregulierte Expression des FL1-Aktivator-Gens *FLK* zurückzuführen. Übereinstimmend ist die Expression des entsprechenden Repressors, *Flowering Locus VE (FVE)*, minimal reprimiert. Auch *Constans-Like 1 (COL1)* steht ebenso wie *FVE*, im offensichtlichen Gegensatz zu seinem Ortholog in *Arabidopsis*, unter der Kontrolle des zirkadianen Rhythmus (Abou-Elwafa *et al.*, 2011; Abou-Elwafa *et al.*, 2012). *COL1* fungiert dabei als positiver Regulator des Blüh-Aktivators *FT2*, was durch die parallele kälteabhängige Hochregulierung der Expression im Blatt verdeutlicht wird (Abbildung 3.6).



Abbildung 3.7 Blühende Zuckerrüben

Repräsentative fotografische Aufnahmen von Blüten dauerhaft kältebehandelter Wiltyp-Zuckerrüben.

Die o.g. Ergebnisse deuten darauf hin, dass Zuckerrüben bei Kälte die zur Blütenvorbereitung benötigte Energie in Form von Zuckern aus dem Wurzelgewebe und nicht aus der photosynthetischen CO_2 -Assimilation gewinnen. Dies ist lediglich aufgrund der beobachteten Umkehr des Phloem-Stroms möglich. Dieses Phänomen kann ebenfalls *in vivo* beobachtet werden. So beginnt eine dauerhaft der Kälte ausgesetzte Zuckerrübe durchaus zu blühen, jedoch erfolgt dies in fast vollkommener Abwesenheit einer Grünfärbung der Blätter (Abbildung 3.7). Demnach scheint die Anwesenheit von Chlorophyll und die damit einhergehende Photosynthese als Zucker-Lieferant unter den genannten Bedingungen keine nennenswerte Rolle zu spielen.

3.1.8 Kälte induziert eine *Sink-* zu *Source*-Transition

Die beobachtete kältebedingte Translokation von Saccharose aus den Pfahlwurzeln zurück in die Blätter ist ein Phänomen, welches aus Ertragssicht besonders ungünstig erscheint. Demnach wäre es von Vorteil Zuckerrüben bereits im Herbst auszusäen und ein gesamtes Jahr wachsen zu lassen, um damit einen bis zu 26% höheren Ertrag zu erhalten. Da das

verfrühte Einsetzen von Kälte augenscheinlich zu einer Abnahme des zuvor in der Wurzel vorhandenen Zuckers zu Gunsten der Blütenbildung führt, müsste die klassische Zuckerrübe zum Erreichen des oben beschriebenen Ziels einer zweijährigen Wachstumsphase, weitergehend optimiert werden.

Basierend auf den in dieser Arbeit aufgedeckten, bei Kälteexposition auftretenden Prozessen, konnten potentielle Ziele zur Modifikation detektiert werden. So könnte beispielsweise eine Abnahme des SUT4- beziehungsweise eine Zunahme des TST2;1-Gehalts zu einem *trapping* der vakuolären Zucker, und daraus resultierend zu einem Verbleib dieser in der Pfahlwurzel führen. Um die physiologische Relevanz der einzelnen Faktoren begutachten zu können, wurden korrespondierende Mutanten untersucht, die jeweils eines der genannten Proteine (über-)exprimieren. Die mithilfe dieser Pflanzen gewonnenen Ergebnisse werden in den folgenden Kapiteln dargelegt.

3.2 Gezielte Modulierung der intrazellulären Zuckerkompartimentierung zur Optimierung der Frosttoleranz sowie des Blühverhaltens von Zuckerrübe und Arabidopsis

Nachdem mit den obigen Daten Hinweise auf Schlüsselkomponenten des Kälteakklimatisierungs-Prozesses in Zuckerrübe erhoben wurden, soll im Folgenden auf die Funktion und die Auswirkung einer überproportionalen Abundanz der einzelnen Faktoren eingegangen werden.

3.2.1 Eine Expression des Zucker-Transporter-Gens *BvSUT4* unterdrückt infolge erhöhter vakuolärer Zuckerfreisetzung die Kälteakklimatisierungseffekte und fördert das Blühverhalten in Arabidopsis

Das frostinduzierte Schossen der Zuckerrüben wird initial durch eine Mobilisierung vakuolär gespeicherter Zucker ermöglicht. Demnach ist die Untersuchung von Pflanzen mit einem beeinträchtigten Export von Zuckern aus der Vakuole von besonderem Interesse zur Bestätigung der in Kapitel 3.1 angestellten Annahmen. Aufgrund der offensichtlich bedeutenden Rolle des vakuolären Entladens *BvSUT4*, wurde zunächst die Bedeutung des durch den Transporter vermittelten Zuckertransports in verschiedenen Zuckerrüben Geweben, unter verschiedenen Bedingungen, sowie die Folgen einer heterologen Expression von *BvSUT4* in Arabidopsis untersucht.

3.2.1.1 Die Expression des vakuolären Zucker-Exporter-Gens *BvSUT4* ist Zucker-reprimiert und kälteinduziert

Der für die vakuoläre Zuckerentladung verantwortliche Transporter aus Zuckerrüben *BvSUT4* scheint maßgeblich an der Kälteakklimatisierung des Rüben Gewebes beteiligt zu sein. Demnach wurden Veränderungen im mRNA-Gehalt von Blatt- sowie Pfahlwurzelgewebe in zucker- oder kältebehandeltem Gewebe analysiert, um zunächst Aufschluss über die natürliche Schwankung der *BvSUT4*-Genexpression als Reaktion auf verschiedener Umwelt- oder Stressbedingung zu erhalten.

In Abbildung 3.8A ist deutlich zu erkennen, dass die Expression des Transportergens sowohl im Blatt- als auch im Pfahlwurzelgewebe Zucker-responsiv ist. Demnach ist die *BvSUT4*-Transkriptabundanz bei Behandlung mit Zuckern im Vergleich zu unbehandelten Blattscheiben um bis zu 64% (Glukose) reduziert. In Rübenscheiben fällt die Glukose-abhängige Expressionsabnahme mit maximal 40% ebenfalls etwas geringer aus. In Gegenwart von Mannitol als Kontrolle ist kein signifikanter Unterschied verglichen mit unbehandelten Gewebescheiben zu beobachten.

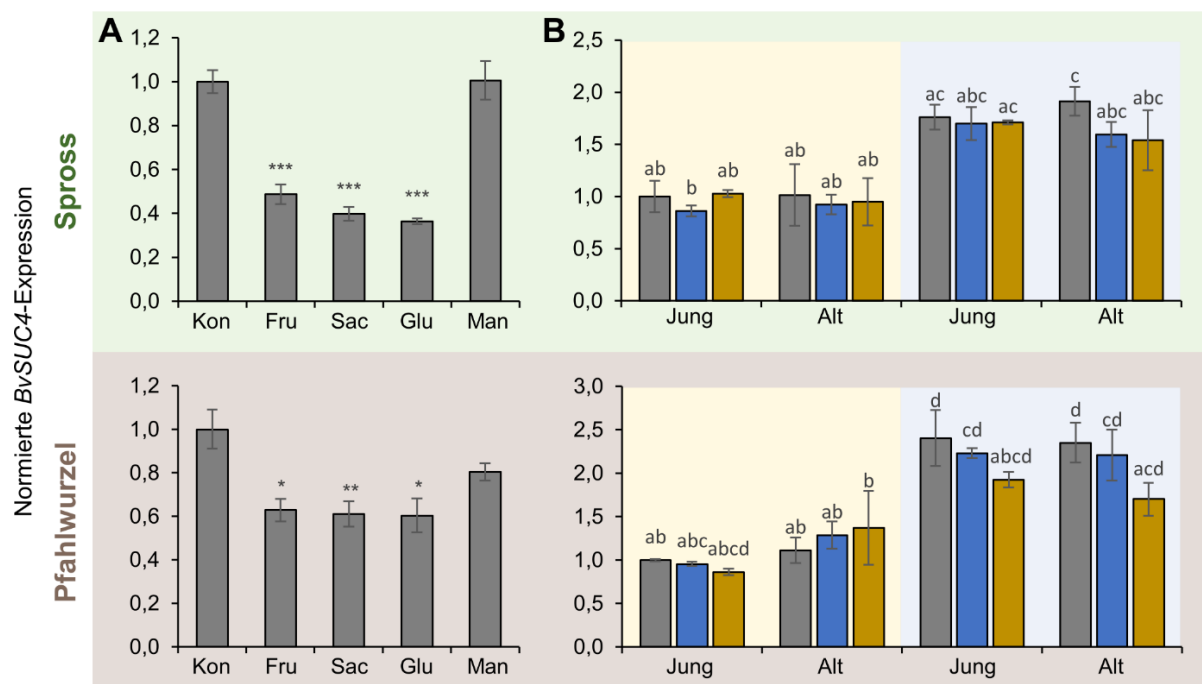


Abbildung 3.8 Zucker- und Temperatur-abhängiges *BvSUT4*-Expressionsmuster.

Dargestellt ist die normierte *BvSUT4*-Transkriptabundanz (A) in Blatt- oder Rübenscheiben 6 Wochen alter Zuckerrüben-Wildtyp-Pflanzen, welche über Nacht im Dunkeln für 16 h in Medium mit 300 mM des entsprechenden Zuckers inkubiert wurden und (B) in Zuckerrübenblättern und -Pfahlwurzeln drei verschiedener Genotypen, welche entweder 7 (Jung) oder 12 (Alt) Wochen bei 20 °C und anschließend eine Woche auf 12 °C und zwei Wochen 4 °C (blau) oder den kompletten Zeitraum auf 20 °C (gelb) angezogen wurden. Die Werte in (A) zeigen Mittelwerte aus 4 biologischen Replikaten jeweils bestehend aus 7 Gewebescheiben zweier Pflanzen $\pm$ SA. Signifikante Änderungen im Vergleich zur Kontrollbedingung wurde mittels *t*-Test berechnet (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$). Die Werte in (B) zeigen Mittelwerte aus 3 biologischen Replikaten $\pm$ SA. Signifikante Unterschiede wurden mittels zweifaktoriellem ANOVA mit anschließendem post-hoc Tukey-Test berechnet ($p \leq 0,05$). Mittelwerte, die keinen Buchstaben gemeinsam haben, sind signifikant unterschiedlich.

Die Kälteeinwirkung hat einen verglichen zur Zucker-Behandlung reziproken Effekt. Dementsprechend ist die *BvSUT4*-mRNA-Menge bei Kälteexposition unabhängig vom Gewebe und Alter der Pflanzen leicht erhöht, wobei der Effekt vor allem in jungem Rüben-gewebe stärker ausgeprägt scheint. So ist für GT1 eine maximal 2,4-fache Erhöhung der Transkriptmenge zu beobachten, im jungen Rüben-gewebe der anderen Genotypen ebenfalls mindestens eine Verdopplung zu verzeichnen ist.

3.2.1.2 Eine Erhöhung des vakuolärer Saccharose-Ausschlusses verursacht einen rapideren kältebedingen Verlust des Rosetten-Wassergehalts einschließlich einer erniedrigten Biomasseproduktion in Arabidopsis

Um zu untersuchen, ob die Hemmung des kälteabhängigen vakuolären Zuckerverlusts die im vorigen Kapitel postulierte positive Wirkung auf die Geschwindigkeit und Richtung des Phloemtranslokationsstroms hat, wurde eine gegenteilige Vorgehensweise angewandt mit dem Ziel, die luminalen Saccharose-Verfügbarkeit zu reduzieren. Hierfür wurde das Homolog des vakuolären Saccharose-Transporters, *AtSUT4*, ein protonengetriebener Saccharose-Exporter (Schneider *et al.*, 2012), in Arabidopsis exprimiert. Als nächstgelegenes Homolog in Zuckerrübe (*Beta vulgaris*) wurde, mit einer Aminosäuresequenz-Übereinstimmung von 67% (BLASTP; <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) *BvSUT4* identifiziert (Dohm *et al.*, 2014). Nach Transformation von Arabidopsis-Pflanzen mit einem *35S::BvSUT4*-Konstrukt wurden die Linien *BvSUT4*-5 und *BvSUT4*-6 als Expressoren identifiziert, die hohe Spiegel mit entsprechenden ektopischen mRNAs aufwiesen (Ergänzende Abbildung 10). Um die beobachteten Effekte besser einordnen zu können, wurde zudem eine Mutantenlinie mit vermeintlich stärker verminderten vakuolären Zuckergehalten ausgewählt, welche eine *BvSUT4*-Expression auf Basis einer Δ *tst2-1*-Mutante aufweist. Darüber hinaus wurde eine Δ *atsut4*-Mutante identifiziert und in einigen Analysen zusätzlich beprobt.

Eine typische Reaktion von Pflanzen nach Eintreten von Kälte ist die Akkumulation von Zuckern. Um zu untersuchen, ob eine heterologe Expression von *BvSUT4* in Arabidopsis dieses charakteristische Verhalten beeinflusst, wurde neben der Biomasse und dem Wassergehalt, ebenfalls eine diurnale Rhythmik des Zuckergehalts der Mutanten, vor und nach Kälteexposition erhoben.

Bei der Ermittlung des durchschnittlichen Frischgewichts sticht mit einem im Schnitt 0,18 g höherem Vergleichswert lediglich die Linie *BvSUT4*-1 hervor. Wird ebenfalls das Trockengewicht betrachtet, fällt das relativ geringe Gewicht der Δ *atsut4*-Mutante auf. Zudem liegen die Werte der beiden *35S::BvSUT4*-Expressoren mit einem Trockengewicht von 0,049 g für *BvSUT4*-6 und 0,048 g für *BvSUT4*-5 sehr nah beieinander (Abbildung 3.9A und B).

Wie bereits in Zuckerrüben beobachtet reagieren scheinbar auch Arabidopsis-Pflanzen mit einem sofortigen Wasserverlust auf eine Kälteexposition, wobei der Wildtyp den Wassergehalt kälteabhängig länger stabilisieren kann als die übrigen Genotypen. Eine Abnahme um 12% ist erst zum vierten Messzeitpunkt zu beobachten, während die *BvSUT4*-Expression bereits zwischen dem zweiten und dritten Messpunkt einen Wasserverlust um 14 (#4-1) bzw. 35% (#4-6) auslöst. Zu beachten ist hierbei der höhere Startwert dieser Linien zum zweiten Messzeitpunkt. Demnach scheint die kälteinduzierte Differenz im Wasserhaushalt prägnanter, je höher der *BvSUT4*-Gehalt (Abbildung 3.9C).

3.2.1.3 Die *BvSUT4*-Expressionstärke reguliert eine kälteverstärkte Verschiebung des Mono- zu Disaccharid-Verhältnisses und beeinflusst die diurnale Stärke-Rhythmik

Das auf den Anfangswert normierte Mono- zu Disaccharid-Verhältnis zeigt ebenfalls genotypische Unterschiede. Während dieses Verhältnis im Wildtypen über Nacht kaum verändert ist, steigt es in allen anderen betrachteten Genotypen, wobei der Anstieg für die *35S::BvSUT4*-Expressoren am höchsten ausfällt, dicht gefolgt von der *Δtst2-1::BvSUT4*-Linie und der *Δatsut4*-Mutante (+ 47%). Dieses Verhalten spricht für eine verstärkte Verschiebung des Zucker-Pools in Richtung der Monosaccharide. Die Umstellung auf niedrige Temperaturen führt zu einem schlagartigen Anstieg des Mono- zu Disaccharid-Verhältnis in der *Δatsut4*-Mutante, was auf den anteilig geringen Saccharose-Spiegel zurückzuführen ist. Auch alle anderen Pflanzenlinien weisen zum betrachteten Zeitpunkt einen erhöhten Mono- im Vergleich zum Disaccharid-Spiegel auf. Das Verhältnis der analysierten Zuckerspezies der *Δatsut4*-Mutante bleibt für den verbleibenden Zeitraum vergleichsweise hoch, während sowohl die *BvSUT4*-exprimierenden Pflanzen als auch der Wildtyp kontinuierlich Saccharose anhäufen, so dass das betrachtete Verhältnis sinkt. Zu berücksichtigen ist ebenfalls, dass die Abnahme des Zucker-Verhältnisses in der *Δtst2-1::BvSUT4*-Linie am geringsten ausfällt (Abbildung 3.9D).

Nach 4 Wochen Wachstum unter Standardbedingungen enthielten die Wildtypen unmittelbar vor Kälteexposition etwa 40 $\mu\text{mol} / \text{gTG}$ Glukose, 14 $\mu\text{mol} / \text{gTG}$ Fruktose und 16 $\mu\text{mol} / \text{gTG}$ Saccharose. Im Gegensatz dazu enthielten alle drei *BvSUT4*-exprimierenden Linien deutlich weniger Monosaccharide, während der Saccharose-Gehalt ähnlich dem Wildtyp-Gehalt war. Der Monosaccharid-Gehalt ist demnach mit einem Glukose-Gehalt von 12 (#4-5) bzw. 13 (#4-6) $\mu\text{mol} / \text{gTG}$ und einem Fruktose-Gehalt von 6 (#4-5) bzw. 7 (#4-6) $\mu\text{mol} / \text{gTG}$ im Vergleich zum Wildtypen um mehr als die Hälfte vermindert, wobei der Saccharose-Gehalt mit Werten von 14 (#4-5) bzw. 16 (#4-6) ähnlich hoch ausfällt. Weniger ausgeprägt ist die Abnahme in der *BvSUT4-1*-Linie, welche lediglich einen Monosaccharid-Verlust von 39% aufweist. In Bezug

zum Monosaccharid-Gehalt steht die $\Delta t s u t 4$ -Mutante mit Werten von 19 $\mu\text{mol} / \text{gTG}$ Glukose und 10 $\mu\text{mol} / \text{gTG}$ Fruktose zwischen den zuvor betrachteten Genotypen, weist jedoch mit einem Gehalt von 6 $\mu\text{mol} / \text{gTG}$ den niedrigsten Saccharose-Wert auf. Unmittelbar nach Kälteapplikation steigt der Zuckergehalt in allen betrachteten Genotypen über den gesamten Zeitraum an. Der Monosaccharid-Gehalt steigt linear, während der Saccharose-Gehalt zum Ende der Aufzeichnung ein Plateau erreicht. Die deutlichsten Unterschiede sind bei der $\Delta t s u t 4$ -Mutante zu beobachten. Demnach liegt der Monosaccharid-Gehalt zu fast jedem Zeitpunkt über, und der Saccharose-Gehalt unter dem der anderen Linien (Abbildung 3.9D bis G).

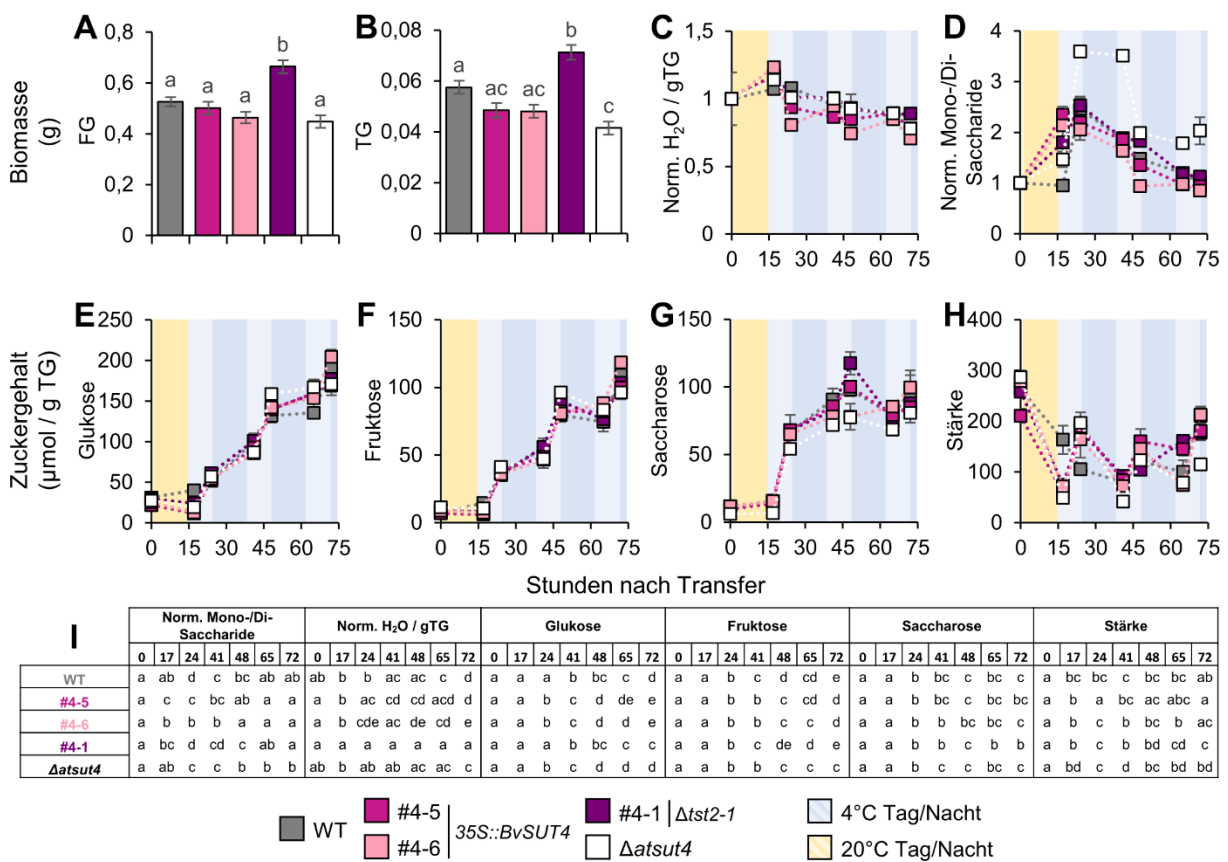


Abbildung 3.9 Biomasse und Zuckergehalt kältebehandelter Arabidopsis-Rosetten.

Verhalten von Rosetten von *BvSUT4*-exprimierenden Pflanzen #4-5 (pink) und #4-6 (rosa) im WT-Hintergrund und #4-1 (violett) im $\Delta t s t 2-1$ -Hintergrund und der $\Delta t s u t 4$ -Mutante (weiß) sowie des korrespondierenden Wildtypen (grau) auf kalte Temperaturen. Die Aufzeichnung der Biomasse und Zuckerakkumulation startete 15 Stunden vor Transfer auf 4 °C. Frischgewicht (FG) (A) und Trockengewicht (TG) (B) von Arabidopsis-Rosetten. Die Datenpunkte zeigen Mittelwerte von $n = 33 \pm \text{SA}$. Signifikante Unterschiede wurden mittels einfaktoriellem ANOVA mit anschließendem post-hoc Tukey-Test berechnet ($p \leq 0,05$). Normiertes Verhältnis von Mono- zu Disacchariden (C), Normierter Wassergehalt ($\text{H}_2\text{O}/\text{gTG}$) (D), Gehalt an Glukose (E), Fruktose (F), Saccharose (G) und Stärke (H) in Arabidopsis-Rosetten. Die Datenpunkte zeigen Mittelwerte von 4 ($t=17;24;41;48;65;72$) oder 12 ($t=0$) Pflanzen $\pm \text{SA}$. Signifikante Unterschiede wurden mittels zweifaktorieller ANOVA mit anschließendem post-hoc Tukey-Test berechnet ($p \leq 0,05$). Mittelwerte, die keinen Buchstaben gemeinsam haben, sind signifikant unterschiedlich.

Bezogen auf den Stärkegehalt sind die Unterschiede zwischen den Genotypen prägnanter. Unter Kontrollbedingungen mobilisieren alle betrachteten Genotypen mit einem Verlust von

71 (#4-1) bis 83% ($\Delta atsut4$) über Nacht deutlich mehr Stärke als der korrespondierende Wildtyp. Trotz Einsetzen der Kälte synthetisieren im Laufe des Tages annähernd alle Genotypen Stärke, lediglich der Wildtyp (WT) zeigt weiter einen Stärkeverlust von 36%. Die Stärkesynthese bei Kälte ist jedoch ungenügend um den anfänglichen Mittelwert über alle Genotypen von rund 260 $\mu\text{mol} / \text{gTG}$ zu erreichen. Dennoch ist der typische diurnale Rhythmus im Stärke-Gehalt noch deutlich zu erkennen, wobei der Ausschlag für die $\Delta atsut4$ -Mutante, mit einem bis zu 4-fachen Anstieg bei Tag (24h/17h) und einer 83%-igen Abnahme bei Nacht (17h/0h) am drastischsten ausfällt (Abbildung 3.9H).

3.2.1.4 Ein verminderter vakuolärer Saccharose-Gehalt hebt den vorteilhaften Effekt einer Kälteakklimatisierung auf

Die im vorherigen Kapitel beobachtete kälteabhängige Akkumulation an löslichen Zuckern sowie die Veränderung der subzellulären Komposition, gilt als Voraussetzung für eine adäquate Akklimatisierung an Temperaturen unter 4 °C. Folglich könnte mit dieser Anpassung eine gesteigerten Frosttoleranz einhergehen. Um eine Aussage darüber treffen zu können wurde die elektrische Leitfähigkeit von Blattgewebe der jeweiligen Pflanze, nach schrittweiser Einwirkung von Gefriertemperaturen bis zu -6 °C, ermittelt.

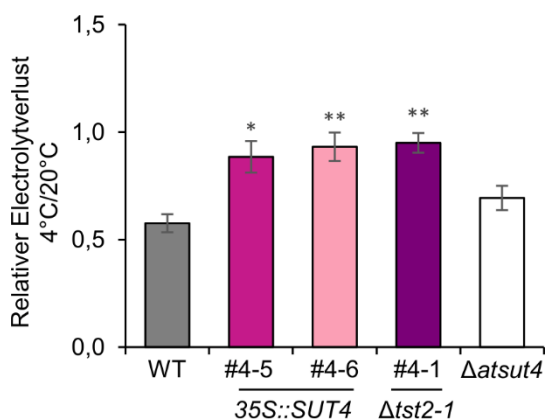


Abbildung 3.10 Frosttoleranz kältebehandelter Arabidopsis-Rosetten.

Dargestellt ist die relative elektrische Leitfähigkeit (4 °C/20 °C) des Wildtypen (grau), der *BvSUT4*-exprimierenden Pflanzen #4-5 (pink) und #4-6 (rosa) im WT-Hintergrund und #4-1 (violett) im $\Delta tst2-1$ -Hintergrund sowie der $\Delta atsut4$ -Mutante (weiß) in Relation zur maximalen elektrischen Leitfähigkeit. Die Balken stellen den Mittelwert von $n = 4$ biologischen Replikaten $\pm$ SA dar. Signifikante Unterschiede zwischen den transgenen Pflanzen zum Wildtypen wurden mittels Student's *t*-Test berechnet (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$).

Die Beobachtung, dass der Quotient aus dem 4 °C- und 20 °C-Werten aller Linien unter einem Wert von 1 liegt bedeutet, dass die vorhergehende Kälteakklimatisierung zu einer gewissen Erhöhung der Frosttoleranz führt.

Unabhängig davon ist ebenfalls ersichtlich, dass alle *BvSUT4*-exprimierenden Pflanzenlinien im Vergleich zu Wildtypen frostsensitiver sind. Demnach erleiden kälteakklimatisierte Wildtypen lediglich einen frostbedingten Elektrolytverlust von 58% , während der Prozentsatz bei den Mutanten zwischen 88% (#4-5) und 95% (#4-1) liegt. Der relative Elektrolytverlust der $\Delta atsut4$ - Mutante fällt zwar auch etwas höher als beim Wildtypen aus, jedoch liegt dieser mit einem Wert von 69% zwischen dem der zuvor betrachteten Linien (Abbildung 3.10).

3.2.1.5 Die Expression Zucker-sensitiver Gene wird durch die Abundanz des vakuolären Zucker-Exporters BvSUT4 reguliert

Eine Veränderung der subzellulären Zuckerverteilung führt unausweichlich zu einer Verschiebung zuckervermittelter Signalprozesse. An dieser Verschiebung sind Enzyme wie die Hexokinase 1 (HXK1) aber auch Transporter wie der Phloem-Lader SUC2 (Saccharose Carrier 2) sowie das Photosynthese-assoziierte Protein CAB1 (Chlorophyll A/B-binding protein 1) beteiligt. Zusätzlich zu der ursprünglichen Rolle im pflanzlichen Metabolismus fungieren alle genannten Proteine primär oder sekundär als Zucker-Sensoren. Demzufolge wurde die Expression der für die genannten Proteine kodierende Gene ermittelt.

Beginnend mit dem Glukose-Sensor HXK1 ist zu beobachten, dass eine *BvSUT4*-Expression mit einer Erniedrigung der *HXK1*-Expression einhergeht. Etwas niedriger fällt diese Expression bei der Δ *atsut4*-Mutante aus. Während die Expression dieses Glukose-afektierten Gens im Wildtyp bei Kälte etwas sinkt, ist diese in den Expressions-Linien tendenziell erhöht. Die zuvor geschilderten Unterschiede sind allerdings nicht signifikant (Abbildung 3.11A).

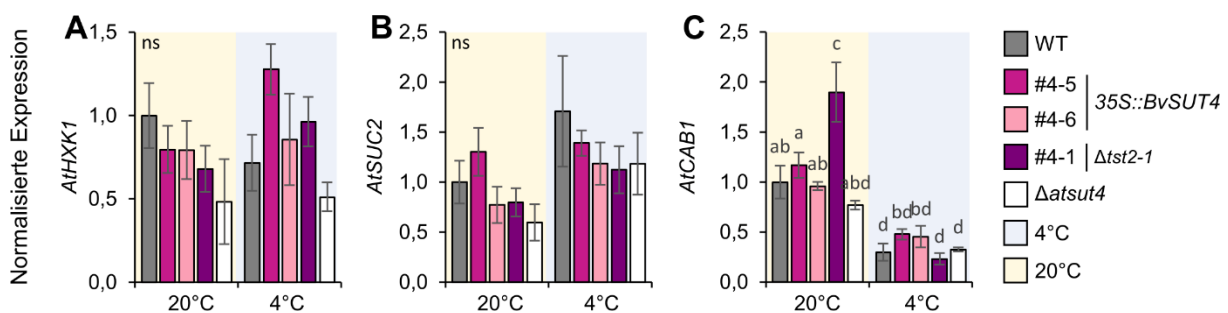


Abbildung 3.11 Expression von Zucker-sensitiven Genen.

Transkriptabundanz von HXK1 (A), SUC2 (B) und CAB1 (C) basierend auf quantitativer qPCR in Arabidopsis-Rosetten der *BvSUT4*-Expressionslinien (pink) sowie des korrespondierenden Wildtypen bei 20 °C (gelb) und 4 °C (blau). Die Werte stellen Mittelwerte aus n = 4 biologischen Replikaten $\pm$ SA dar. Signifikante Unterschiede wurden mittels zweifaktoriellem ANOVA mit anschließendem post-hoc Tukey-Test berechnet ($p \leq 0,05$). Mittelwerte, die keinen Buchstaben gemeinsam haben, sind signifikant unterschiedlich.

Ebenfalls nicht signifikant, aber dennoch einen Trend zeigend, ist die Expression des Gens das für den Phloem-beladenden SUC2 kodiert. Die Kälteexposition führt demnach generell zu einer leichten Erhöhung der Expression unabhängig vom Genotyp. Der Effekt ist sowohl in Wildtypen, mit einer Erhöhung um 70%, als auch in der Δ *atsut4*-Mutante, mit einer annähernden Verdopplung der Expression bei Kälte, besonders ausgeprägt (Abbildung 3.11B).

Das Gen des ebenfalls kernkodierten CAB1 Proteins ist unter Kontrollbedingungen, mit einem 90% höheren Wert als beim Wildtyp, besonders stark in der #4-1-Linie exprimiert. Kälte scheint die Expression des Gens zu unterdrücken. Eine starke Abnahme ist in Wildtyp-Pflanzen zu

beobachten, welche eine Abnahme um 70% aufweisen, wohingegen die Minderung der *CAB1* mRNA Gehalte in beiden *35S::BvSUT4*-Linien lediglich bei 53 (#4-6) bis 59% (#4-5) liegt. Am stärksten ist dieser Effekt, mit einem Verlust von 88% der ursprünglichen *CAB1*-Expression, in der Δ *tst2-1::BvSUT4-1*-Linie auftretend, was möglicher Weise durch das hohe Expressionsniveau des Gens unter Kontrollbedingung bedingt ist (Abbildung 3.11C).

3.2.1.6 Ein verminderter vakuolärer Saccharose-Gehalt ist vorteilhaft für das Blühverhalten und das Samengewicht

Wie bereits in zuvor beschrieben führt eine Verschiebung der subzellulären Zuckerverteilung und die daraus resultierende Regulierung Zucker-sensitiver Signalprozesse oftmals zu einer Anpassung des Langstreckentarnsports und somit auch der Zuckerverteilung in der Gesamtpflanze.

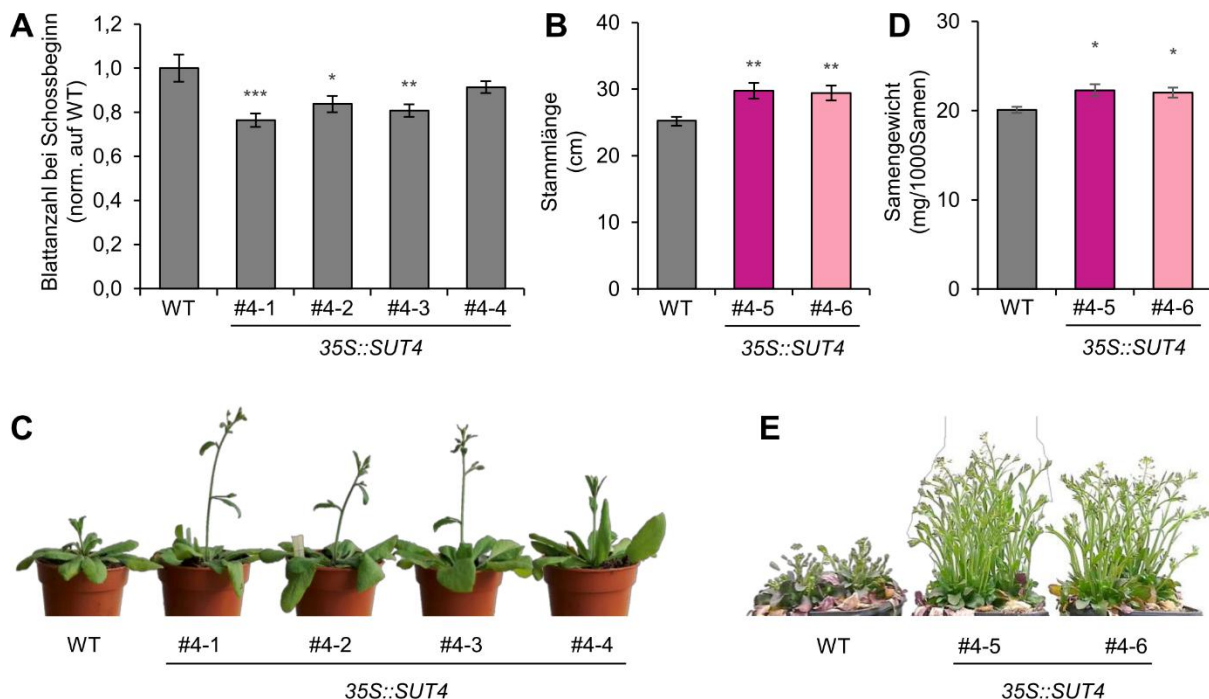


Abbildung 3.12 Analyse des Blühverhaltens und Samengewichts.

(A) Blattanzahl bei Schossbeginn. (B) Maximale Stammlänge in cm, (D) Gewicht von 1000 Samen, (C) Photographische Abbildung repräsentativer und *BvSUT4*-Expressionslinien (pink) sowie des korrespondierenden Wildtypen (grau) unmittelbar nach Schossbeginn des Wildtypen. (E) Photographische Abbildung dauerhaft kälteexponierter Arabidopsis-Pflanzen unmittelbar nach Schossbeginn des Wildtypen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens n = 8 (A), 13 (B) oder 5 (D) biologischen Replikaten ± SA. Signifikante Unterschiede wurden mittels t-Test ermittelt (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$).

Obwohl die Beobachtungen zur *SUC2*-Expressionsstärke in den verschiedenen Linien dies nicht vermuten lässt, scheint eine *BvSUT4*-Expression zu einer Verschiebung der vorhandenen Kohlenhydrate in Richtung der Zucker-konsumierenden bzw. speichernden Organe zu fördern. Demnach zeigen die *BvSUT4*-exprimierenden Linien ein verfrühtes

Schossen, welches in einer erhöhten Stammlänge mündet (Abbildung 3.12A bis C). Des Weiteren weisen die Samen der 35S::*BvSUT4*-Pflanzen im Vergleich zu korrespondierenden Wildtypen eine leicht erhöhte Biomasse auf (Abbildung 3.12D). Besonders prominent ist der Effekt nach einer dauerhaften Kälteexposition. Während bei den Wildtypen kaum eine Infloreszenz zu erkennen ist, weisen die Expressoren eine hochgewachsene Infloreszenz auf (Abbildung 3.12E).

3.2.1.7 *BvSUT4*-Expressoren zeigen unabhängig von der Umgebungstemperatur erhöhte Nitrat- und reduzierte Natrium-Gehalte

Aufgrund der Tatsache, dass eine Vielzahl an Ionen über die Petiolen in der gesamten Pflanzen verteilt werden (Knoblauch *et al.*, 2016; Münch, 1930; Schepper *et al.*, 2013; Turgeon und Wolf, 2009), stellt die Analyse des Ionen-Gehalts eine weitere Methode dar um Veränderungen im Langstreckentransports zu untersuchen. Repräsentativ für den Gesamthaushalt wurden als kanonische Kandidaten hierfür der Natrium-, Kalium-, Calcium- sowie der Nitratgehalt im Blattgewebe der Pflanzen bestimmt.

Bei einer ersten Betrachtung der Kationengehalte über den Zeitverlauf ist lediglich im Natriumgehalt eine deutlicher Unterschied zwischen den drei Genotypen zu erkennen. Die Werte der *BvSUT4*-exprimierenden Pflanzen liegen bereits unter Kontrollbedingungen, sowohl am Abend als auch am Morgen, im Schnitt 26% unter denen der Wildtypen (Abbildung 3.13A). Ein weiterer Trend ist in der Entwicklung der Calcium-Gehalte über Nacht zu beobachten. Diese steigen im Vergleich zum Wildtypen stark an, gefolgt von einem starken Abfall bei Kälteeintritt. Besonders deutlich ist dies in der #4-5-Linie zu sehen (Abbildung 3.13C).

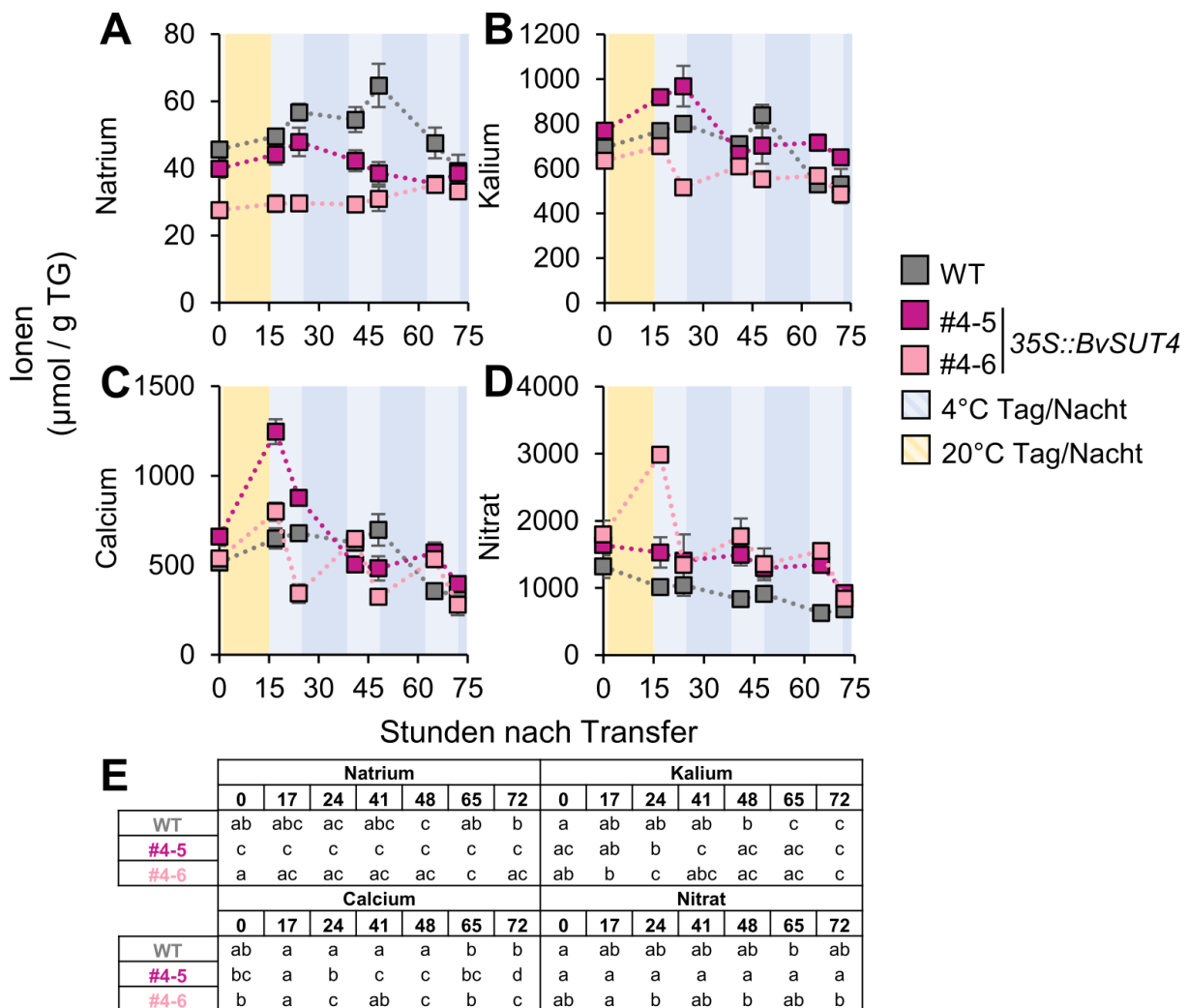


Abbildung 3.13 Ionen-Gehalt kältebehandelter Arabidopsis-Rosetten.

Dargestellt ist der Natrium- (A), Kalium- (B), Calcium- (C), Nitrat-Gehalt (D) von kältebehandelter *BvSUT4*-Expressionslinien (pink) sowie des korrespondierenden Wildtypen (grau). Die Datenpunkte zeigen Mittelwerte von 12 ($t=0$) oder 4 ($t=17-72$) Pflanzen $\pm$ SA. Signifikante Unterschiede wurden mittels zweifaktoriellem ANOVA mit anschließendem post-hoc Tukey-Test berechnet (E; $p \leq 0,05$). Mittelwerte, die keinen Buchstaben gemeinsam haben, sind signifikant unterschiedlich.

Deutlicher zu unterscheiden sind die Genotypen in ihren Nitrat-Gehalt, welcher repräsentativ für den Gesamt-Anionen-Gehalt steht. Zunächst fällt auf, dass der Nitrat-Gehalt der Mutanten unabhängig von der Spezies insgesamt zumindest minimal über dem der Wildtypen liegt. Auch nach der Kälteexposition ist bezogen auf den Wildtypen weiterhin eine diurnalen Rhythmik erkennbar. Während der Nitrat-Spiegel im Wildtypen über Nacht ab- und tagsüber leicht zunimmt, verhält sich dieser in den Mutanten entgegengesetzt. In Summe sinkt der Nitrat-Gehalt über den betrachteten Zeitraum in allen betrachteten Genotypen (Abbildung 3.13D).

3.2.1.8 Der Citrat-Zyklus ist abhängig von der subzellulären Zuckerverteilung

Kohlenhydrate dienen auf subzellulärer Ebene als Ausgangsprodukt der mitochondriellen Energiegewinnung. Das bei der Glykolyse produzierte Pyruvat wird zu Acetyl-CoA umgesetzt,

welches im Citratzyklus zur Gewinnung von Elektronen für die Atmungskette oxidiert wird. Demnach könnte ein erhöhter Zuckerexport aus der Vakuole in das Zytosol Auswirkungen auf die beschriebenen Folgeprozesse haben.

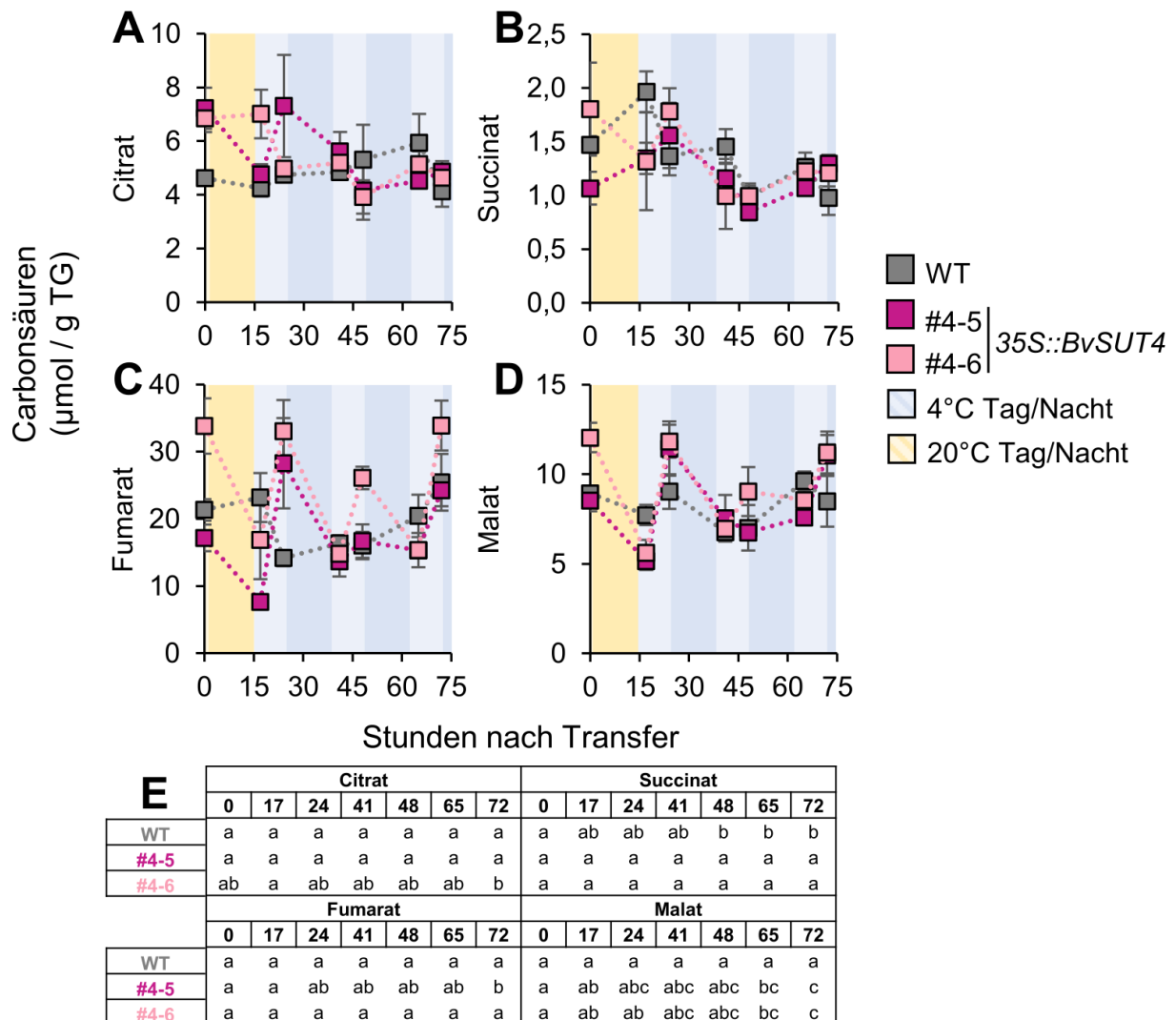


Abbildung 3.14 Carbonsäure-Gehalt kältebehandelter Arabidopsis-Rosetten.

Dargestellt ist der Citrat- (A), Succinat- (B), Fumarat- (C) und Malat-Gehalt (D) kältebehandelter *BvSUT4*-Expressionslinien (pink) sowie des korrespondierenden Wildtypen (grau). Die Datenpunkte zeigen Mittelwerte von 12 ($t=0$) oder 4 ($t=17-72$) Pflanzen $\pm$ SA. Signifikante Unterschiede wurden mittels zweifaktoriellem ANOVA mit anschließendem post-hoc Tukey-Test berechnet (E; $p \leq 0,05$). Mittelwerte, die keinen Buchstaben gemeinsam haben, sind signifikant unterschiedlich.

Citrat ist das erste Produkt welches nach dem Einleiten des Acetyl-CoA in den Citratzyklus gebildet wird. Unter Kontrollbedingungen enthalten die *BvSUT4*-exprimierenden Pflanzen am Abend im Schnitt 2,4 $\mu\text{mol} / \text{gTG}$ mehr Citrat als der korrespondierende Wildtyp. 24h Stunden nach Applikation der Kälte nähern sich die Werte denen des Wildtypen, fallen jedoch am Abend desselben Tages unter die des Wildtypen (Abbildung 3.14A).

Nach drei Zwischenschritten wird unter NAD^+ -Reduktion aus dem C6-Körper der C4-Körper Succinat gebildet. Anfänglich ist kein eindeutiges Bild zu erkennen, jedoch ist unmittelbar nach

Kälteeintritt eine Succinat-Akkumulation, während beim Wildtyp eine -Reduktion zu beobachten ist. Daraufgehend nimmt der Wildtyp einen diurnalen Zyklus, mit höheren Succinat-Werten am morgen und niedrigeren am Abend an. Die SUT4-Expressoren zeigen eine lineare Abnahme des Succinat-Gehalts bis zu einem Tiefpunkt von 0,85 (#4-5) und 1,00 $\mu\text{mol} / \text{gTG}$ (#4-6) bei der 48h-Messung, und weisen daraufgehend Wildtyp-ähnliche Succinat-Gehalte auf (Abbildung 3.14B).

Die unmittelbar im Citratzyklus folgende Carbonsäure ist das Fumarat. Während der Fumarat-Gehalt im Wildtypen über Nacht bei Kontrollbedingungen leicht ansteigt, sinkt dieser in den *BvSUT4*-exprimierenden Pflanzen um 50 (#4-6) bis 55% (#4-5), steigt daraufhin auf durchschnittlich 31 $\mu\text{mol} / \text{gTG}$, wohingegen der Fumarat-Gehalt im Wildtypen wieder leicht abnimmt. Dieses gegensätzliche Verhalten der Mutanten verglichen zum Wildtypen hält bis zu dem 65h-Zeitpunkt an (Abbildung 3.14C).

Eine ähnlich drastische Änderung als Reaktion auf die Kälteexposition ist bei Betrachtung des Malat-Gehalts zu erkennen. Hierbei ist ebenfalls eine Erhöhung des Carbonsäure-Gehalts um durchschnittlich 54% für die Mutanten zu erkennen. Der Effekt ist ebenfalls beim Wildtypen zu beobachten, mit einer minimalen Erhöhung von 14% aber weniger stark ausgeprägt. Bereits beim 41h-Messzeitpunkt gleichen sich die Werte aller Genotypen an (Abbildung 3.14D).

3.2.2 Eine Expression des Zucker-Tranporter-Gens *BvIMP2* aktiviert infolge erhöhter vakuolärer Zuckerspeicherung den Langstreckentransport

Nachdem der gegenteilige Ansatz bereits erste Hinweise darauf lieferte, dass ein vakuoläres Zucker *trapping* eine direkte Auswirkung auf den Langstreckentransport hat, wurde weitergehend die Auswirkung der Expression eines vakuolären Zuckertransporters aus Zuckerrübe in Arabidopsis und anschließend weiterer Zuckertransporter in Zuckerrübe selbst analysiert.

3.2.2.1 Identifizierung eines Zucker-Beladers aus Zuckerrübe-Vakuolen

Zunächst wurde das Zuckerrüben-Homolog des noch unvollständig charakterisierten AtERDL4 (**E**ARLY **R**ESPONSE TO **D**EHYDRATION **L**IKE 4) analysiert. Hierbei handelt es sich um ein Homolog zu AtERDL6 (Klemens *et al.*, 2014; Poschet *et al.*, 2011), welcher als Glukose-Exporter beschrieben ist. Als nächstgelegenes Homolog zu AtERDL4 in Zuckerrübe (*Beta vulgaris*) wurde, mit einer Aminosäuresequenz-Übereinstimmung von 67% (BLASTP; <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), *BvIMP2* identifiziert. Die Benennung erfolgte in Anbetracht der phylogenetischen Nähe zu einem Homolog in Zuckerrübe namens *BvIMP1* (Ergänzende Abbildung 12). Die transiente Expression einer N-terminalen Fusion der

kodierenden *BvIMP2*-Sequenz an GFP in Tabak-Mesophyll-Protoplasten oder Epidermiszellen zeigte eindeutig eine Tonoplasten-Lokalisation (Abbildung 3.15A).

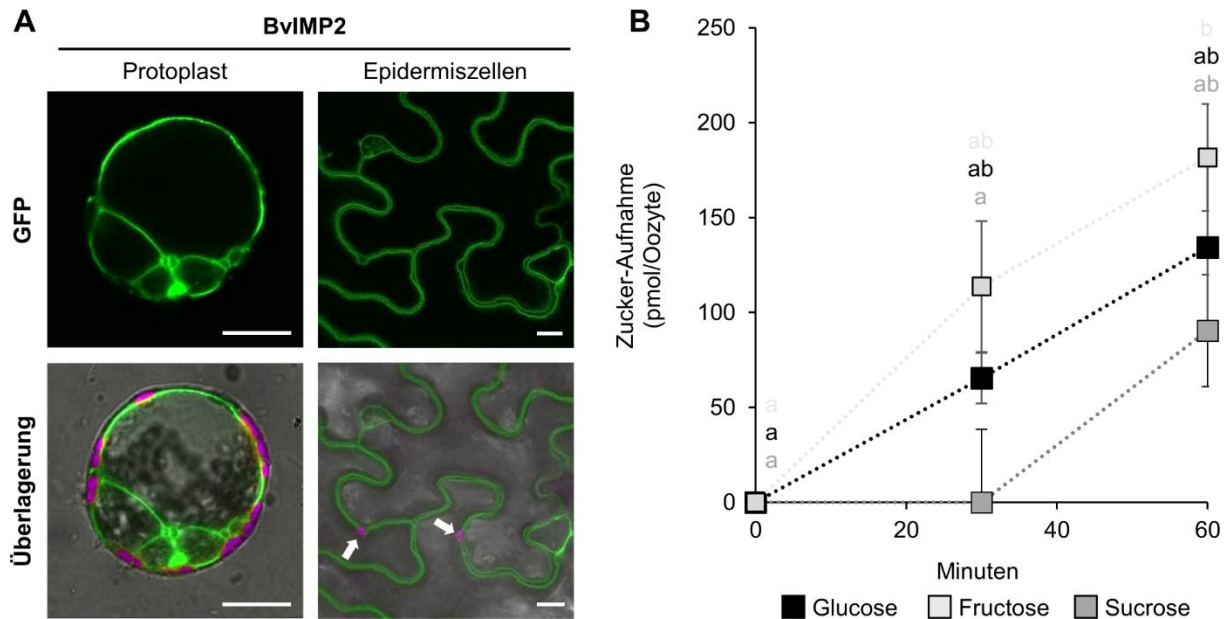


Abbildung 3.15 Initiale Charakterisierung des BvIMP2-Transporters.

(A) Subzelluläre Lokalisation von BvIMP2-GFP in Blattmesophyll-Protoplasten und Epidermiszellen aus *Nicotiana bentamiana*. In allen Bildern sind einzelne optische Schnitte dargestellt. Pfeilspitzen zeigen auf die Chloroplasten-Autofluoreszenz (violett), welche von der im Tonoplasten lokalisierten Transporter-GFP-Fluoreszenz umschlossen wird. Grüne Farbe, GFP-Signal; violette Farbe, Chlorophyll-Autofluoreszenz. Balken = 12,5 mm.

(B) Zeitabhängige Aufnahme von ^{14}C -markierten Zucker in *X. laevis*-Oozyten nach heterologer *BvIMP2*-Expression. Die Datenpunkte zeigen Mittelwerte von 4 biologischen Replikaten $\pm$ SA. **(I)** Signifikante Unterschiede wurden mittels zweifaktoriellem ANOVA mit anschließendem post-hoc Tukey-Test berechnet ($p \leq 0,05$). Mittelwerte, die keinen Buchstaben gemeinsam haben, sind signifikant unterschiedlich.

Um einschätzen zu können, ob es sich bei dem analysierten Protein tatsächlich um einen Zuckertransporter handelt, wurde dieser zunächst heterolog in Oozyten des südafrikanischen Krallenfrosch *Xenopus laevis* exprimiert. Daraufhin konnten diese für die angegebenen Zeitraum in einer Lösung mit ^{14}C -markierten Zuckern inkubiert werden. Der in die mehrfach gewaschenen Oozyten aufgenommene Zucker konnte mittels eines Szintillationszählers quantifiziert und auf die Strahlungsstärke unmarkierter Oozyten normiert werden. Der nahezu lineare Anstieg deutet darauf hin, dass alle drei analysierten Zucker-Spezies zum Transport durch den IMP2 akzeptiert zu werden. Am effizientesten ist der Transport von Saccharose, dessen Aufnahme mit einem Höchstwert von 180 pmol/Oozyte nach einer Stunde erfolgt (Abbildung 3.15B).

3.2.2.2 Die Expression des vakuolären Zucker-Importer-Gens *BvIMP2* ist Zucker-reprimiert und kälteinduziert

Ob eine Expression des Zuckerrüben-Transporters in Arabidopsis bezüglich der Aufklärung kälteabhängiger Prozesse ein sinnvolles Experiment darstellt, wurden Veränderungen in dem

entsprechenden mRNA-Gehalt in Blatt- sowie Pfahlwurzelgewebe als Reaktion auf Zucker- oder Kältebehandlung analysiert.

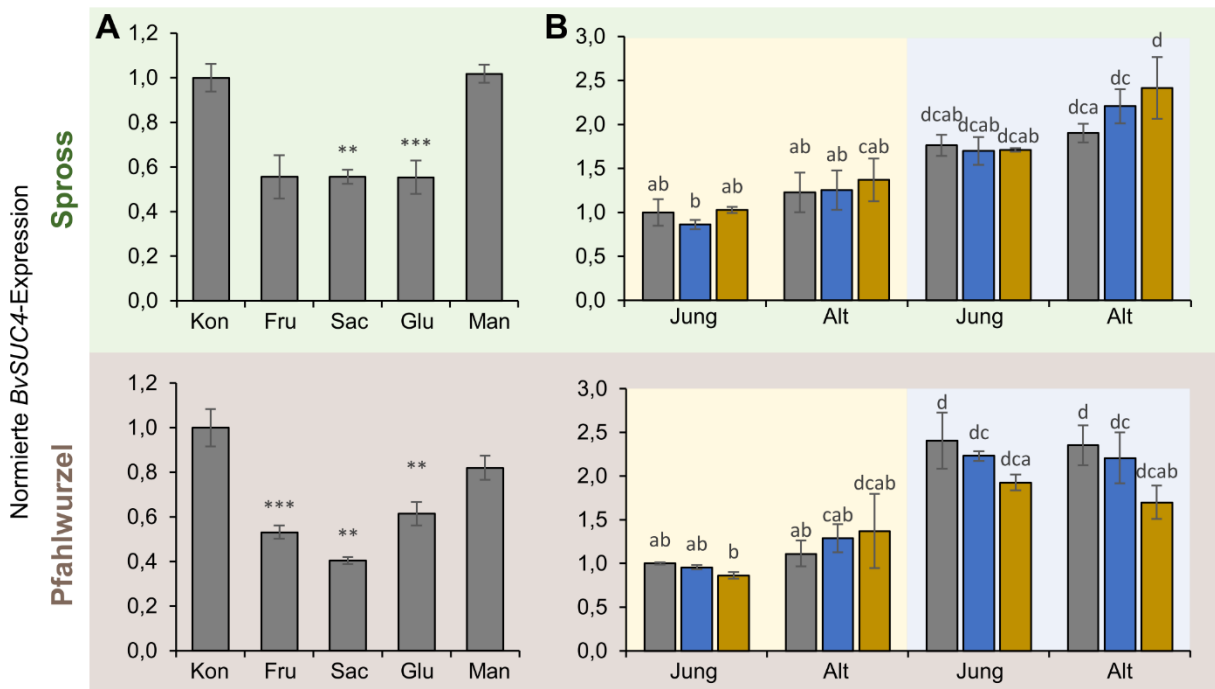


Abbildung 3.16 Zucker- und Temperatur-abhängiges *BvIMP2*-Expressionsmuster.

Dargestellt ist die normierte *BvIMP2*-Transkriptabundanz **(A)** in Blatt- oder Rübenscheiben 6 Wochen alter Zuckerrüben-Wildtyp-Pflanzen, welche über Nacht im Dunkeln für 16h in Medium mit 300mM des entsprechenden Zuckers inkubiert wurden und **(B)** in Zuckerrübenblättern und -Pfahlwurzeln drei verschiedener Genotypen, welche entweder 7 (Jung) oder 12 (Alt) Wochen bei 20 °C und anschließend eine Woche auf 12 °C und zwei Wochen 4 °C (blau) oder den kompletten Zeitraum auf 20 °C (gelb) angezogen wurden. Die Werte in **(A)** zeigen Mittelwerte aus 4 biologischen Replikaten jeweils bestehend aus 7 Gewebescheiben zweier Pflanzen $\pm$ SA. Signifikante Änderungen im Vergleich zur Kontrollbedingung wurde mittels Student's *t*-Test berechnet (** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$). Die Werte in **(B)** zeigen Mittelwerte aus 3 biologischen Replikaten $\pm$ SA. Signifikante Unterschiede wurden mittels zweifaktoriellem ANOVA mit anschließendem post-hoc Tukey-Test berechnet ($p \leq 0,05$). Mittelwerte, die keinen Buchstaben gemeinsam haben, sind signifikant unterschiedlich.

In Abbildung 3.16A ist deutlich zu erkennen, dass die Expression des Transporters, ebenso wie schon für *BvSUT4* beobachtet, sowohl im Blatt- als auch im Pfahlwurzelgewebe Zucker-responsiv ist. Im Unterschied zu der *BvSUT4*-Expression ist die zuckerbedingte Abnahme (60% für Saccharose) stärker in den Rübenscheiben verglichen zu einer 45% Minderung durch Einwirkung aller drei Zucker im Sprossgewebe. In Gegenwart von Mannitol ist kein signifikanter Unterschied verglichen mit unbehandelten Gewebescheiben zu verbuchen.

Die Kälteeinwirkung hat einen zur Zucker-Behandlung konträren Effekt. Dementsprechend ist die *BvIMP2*-mRNA-Menge bei Kälteexposition unabhängig vom Gewebe und Alter der Pflanzen leicht erhöht, wobei der Effekt vor allem in jungem Rüben- und Pfahlwurzelgewebe ausgeprägt scheint. So ist für GT1 eine maximal 2,4-fache Erhöhung der Transkriptmenge zu beobachten, wobei im jungen Rüben- und Pfahlwurzelgewebe der anderen Genotypen ebenfalls mindestens eine Verdopplung zu verzeichnen ist.

Die vorgestellten Ergebnisse deuten auf eine wesentliche Rolle des *BvIMP2*-Transporters bei der Fein-Justierung des Zuckerhaushalts. Da insbesondere die Kälteakklimatisierungsbedingte Veränderung der subzellulären Zucker-Komposition durch die Transkriptabundanz von *BvIMP2* gesteuert zu sein scheint, fokussieren sich die folgenden Kapitel auf diesen Aspekt.

Zur Aufklärung der Rolle des *IMP2*-Transporters innerhalb der Gesamt-Pflanze wurde dieser heterolog in *Arabidopsis* exprimiert. Eine Transformation mit einem *35S::BvIMP2*-Konstrukt führte zur Identifikation zweier Expressionslinien, *BvIMP2*-4-5 und *BvIMP2*-1-8, die hohe Spiegel mit entsprechenden ektopischen mRNAs aufwiesen (Ergänzende Abbildung 11).

3.2.2.3 Eine Erhöhung der vakuolären Zucker verursacht einen rapideren kältebedingten Verlust des Rosetten-Wassergehalts trotz einer leicht erhöhten Biomasseproduktion

Bereits die Beobachtung des Gewichts bzw. Wassergehalts der *BvSUT4*-exprimierenden Pflanzen zeigte, dass eine veränderte subzelluläre Zuckerkomposition einen Einfluss auf die Pflanzengröße hat. Bei den *BvIMP2*-exprimierenden Pflanzen sticht besonders die Linie #1-8 hervor, welche ein um 0,013 g höheres Trockengewicht als der Wildtyp aufweist (Abbildung 3.17A bis C).

In den vorherigen Kapiteln wurde zudem eine kältebedingte Abnahme des Wassergehalts unabhängig von der Pflanzen-Spezies beobachtet. Demensprechend ist dieser Akklimatisierungs-Effekt ebenfalls in dem hier vorliegenden Experiment zu erkennen. Trotz einer entgegengesetzten Zucker-Transport-Richtung innerhalb der Zelle sind wie die *BvSUT4*-exprimierenden Pflanzen ebenso die *BvIMP2*-exprimierenden verglichen zum Wildtypen nicht in der Lage das Wasser auch während der Kälteexposition zu fixieren. So zeigt der Wildtyp eine Abnahme des Wassergehalts zum letzten Messzeitpunkt, verglichen zum ersten Zeitpunkt, um lediglich 13% hingegen die Mutanten einen Verlust von 21 (#4-5) und 25% (#1-8) aufweisen (Abbildung 3.17C).

3.2.2.4 Die *BvIMP2*-Expressionstärke reguliert eine kälteverstärkte Verschiebung des Mono- zu Disaccharid-Verhältnisses

Ebenso wie der auf den Anfangswert normierten Wassergehalt ist das normierte Mono- zu Disaccharid-Verhältnis durch Kälte beeinflusst. Demnach steigt dieses fast unmittelbar nach Kälteeintritt. Am stärksten ist der Effekt in den *BvIMP2*-exprimierenden Pflanzen, bei welchen das Verhältnis verglichen zum Ausgangswert um das 2,3- (#1-8) oder sogar 2,7-fache (#4-5) ansteigt, wohingegen das Verhältnis im Wildtypen lediglich verdoppelt wird (Abbildung 3.17D).

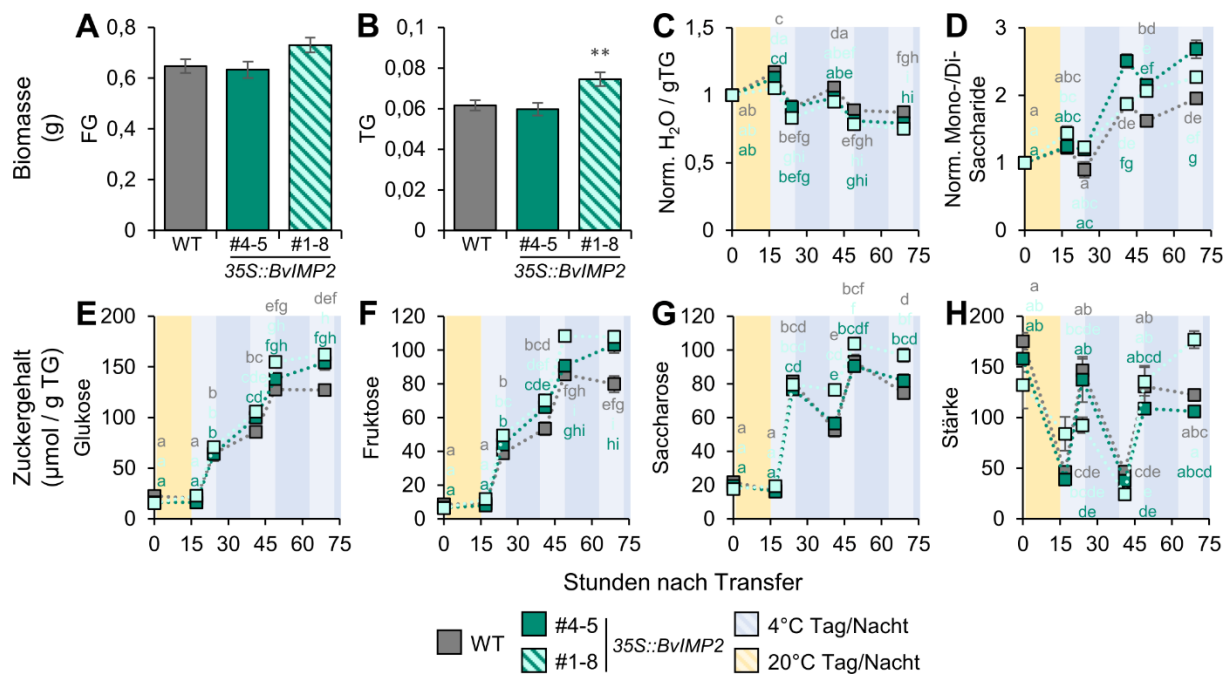


Abbildung 3.17 Biomasse und Zuckergehalt kältebehandelter Arabidopsis-Rosetten.

Verhalten von Rosetten zweier *BvIMP2*-Expressionslinien (türkis) sowie des korrespondierenden Wildtypen (grau) auf kalte Temperaturen. Die Aufzeichnung der Biomasse und Zuckerakkumulation startete 15 Stunden vor Transfer auf 4 °C. Frischgewicht (FG) (A) und Trockengewicht (TG) (B) von Arabidopsis-Rosetten. Die Datenpunkte zeigen Mittelwerte von $n = 33 \pm SA$. Signifikante Unterschiede in wurden wurden mittels Student's *t*-Test berechnet (** $p \leq 0,01$). Normiertes Verhältnis von Mono- zu Disacchariden (C), Normierter Wassergehalt (H₂O/gTG) (D), Gehalt an Glukose (E), Fruktose (F), Saccharose (G) und Stärke (H) in Arabidopsis-Rosetten. Die Datenpunkte zeigen Mittelwerte von 4 ($t=17;24;41;48;65;72$) oder 12 ($t=0$) Pflanzen $\pm SA$. Signifikante Unterschiede wurden mittels zweifaktoriellem ANOVA mit anschließendem post-hoc Tukey-Test berechnet ($p \leq 0,05$). Mittelwerte, die keinen Buchstaben gemeinsam haben, sind signifikant unterschiedlich.

Das ansteigende Mono- zu Disaccharid-Verhältnis scheint eher durch den Anstieg an Glukose und Fruktose als durch eine Verringerung des Saccharose-Gehalts bedingt zu sein. Demnach steigt der Gehalt aller betrachteten Zuckerspezies zwar an, jedoch erreichen die *BvIMP2*-Expressoren Glukose-Werte von 154 (#4-5) und 163 (#1-8) $\mu\text{mol} / \text{gTG}$ und Fruktose-Werte von 103 (#4-5) und 108 (#1-8) $\mu\text{mol} / \text{gTG}$, hingegen der Wildtyp lediglich einen Glukose-Level von 127 $\mu\text{mol/gTG}$ und einen Fruktose-Level von 80 $\mu\text{mol/gTG}$ erreicht (Abbildung 3.17E bis G).

Auch unabhängig von der Behandlung sind Unterschiede zwischen den Genotypen zu erkennen. Unter Standardbedingungen beinhalten am Abend sowohl die Linie #1-8 als auch #4-5 weniger Zucker. Besonders deutlich ist der Unterschied bei Betrachtung des Glukose-Gehalts, welcher zum ersten Messzeitpunkt im Schnitt 6,7 $\mu\text{mol} / \text{gTG}$ unter dem des Wildtypen liegt (Abbildung 3.17E bis G).

Bezogen auf den Stärkegehalt ist besonders das Verhalten der *BvIMP2*-exprimierenden Genotypen unter Standardbedingungen auffällig. Demnach liegt der anfängliche Stärkegehalt der Mutanten mit 158 (#4-5) und 132 (#1-8) $\mu\text{mol} / \text{gTG}$ um 10 bzw. 17% unter dem des

Wildtypen mit 175 $\mu\text{mol/gTG}$. Bei weitergehender Betrachtung des Stärkegehalt-Verlaufs ist zwar eine Reaktion auf die Diurnaltät deutlich zu erkennen, jedoch sind die Genotypen nicht unterscheidbar (Abbildung 3.17H).

Allgemein ist zu beobachten, dass zwar beide *BvIMP2*-exprimierenden Linien dieselbe Tendenz zeigen, der metabolischen Reaktionen in der Linie #1-8 vergleichsweise stärker ausfällt.

3.2.2.5 Ein erhöhter *BvIMP2*-Gehalt verringert den vorteilhaften Effekt einer Kälteakklimatisierung auf die Frosttoleranz

Eine Zuckerakkumulation bringt oftmals eine erhöhte Frosttoleranz mit sich. Die Messung der Elektrolytleitfähigkeit bietet eine geeignete Methode, um eine Einschätzung über die Sensitivität gegenüber Frost der einzelnen Linien zu erhalten.

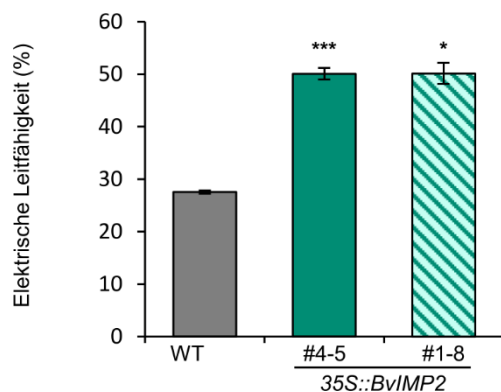


Abbildung 3.18 Frosttoleranz kältebehandelter Arabidopsis-Rosetten.

Dargestellt ist die elektrische Leitfähigkeit des Wildtypen (grau), sowie der *BvIMP2*-exprimierenden Pflanzen (türkis) in Relation zur maximalen elektrischen Leitfähigkeit. Die Balken stellen den Mittelwert von $n = 4$ biologischen Replikaten $\pm$ SA dar. Signifikante Unterschiede zwischen den transgenen Pflanzen zum Wildtypen wurden mittels Student's *t*-Test berechnet (* $p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,001$).

Die kältebehandelten *BvIMP2*-Pflanzen zeigen verglichen zum Wildtypen eine stark erhöhte Elektrolytleitfähigkeit von etwa 50%. Demnach scheinen diese trotz der Zucker-Akkumulation sensibler auf Frost zu reagieren.

3.2.2.6 Die Expression Zucker-sensitiver Gene wird durch die Abundanz des vakuolären Zucker-Exporters *BvIMP2* reguliert

Bereits in Kapitel 3.2.1.5 wurde festgestellt, dass eine Umverteilung der subzellulären Zucker zu einer Veränderung zuckervermittelter Signalprozesse führen kann. Demnach wurde die Expression von *HXK1*, *SUC2* und *CAB1* ermittelt und folgend abgebildet.

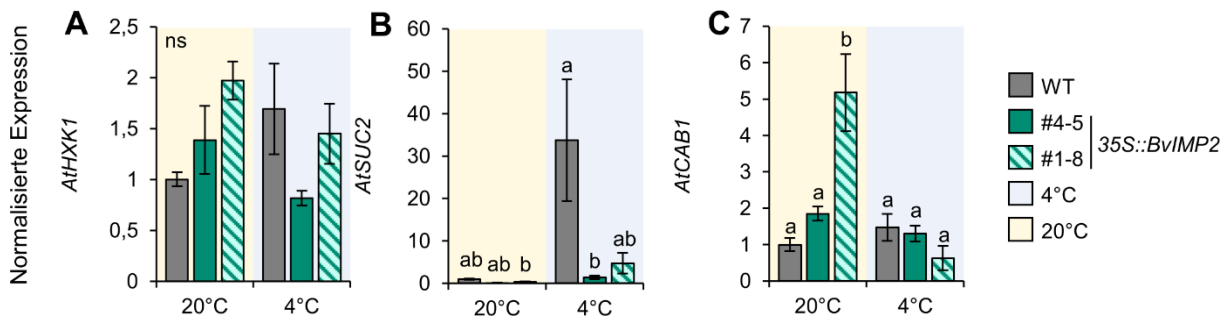


Abbildung 3.19 Expression Zucker-sensitiven Gene.

Transkriptabundanz von HXK1 (A), SUC2 (B) und CAB1 (C) basierend auf quantitativer qPCR in Arabidopsis-Rosetten der *BvIMP2*-Expressionslinien (türkis) sowie des korrespondierenden Wildtypen (grau) bei 20 °C (gelb) und 4 °C (blau). Die Werte stellen Mittelwerte aus $n = 4$ biologischen Replikaten $\pm$ SA dar. Signifikante Unterschiede wurden mittels zweifaktorieller ANOVA mit anschließendem post-hoc Tukey-Test berechnet ($p \leq 0,05$). Mittelwerte, die keinen Buchstaben gemeinsam haben, sind signifikant unterschiedlich.

Eine *BvIMP2*-Expression geht mit einer leichten Erhöhung der HXK-Expression einher, welche bei Kälteeinwirkung jedoch sinkt, wohingegen der Wildtyp ein umgekehrtes Muster zeigt (Abbildung 3.19A).

Weitergehend ist die *SUC2*-Expression in den *IMP2*-exprimierenden Pflanzen reduziert. Eine kältebedingte Zunahme wie sie für den Wildtyp zu beobachten ist, scheint ebenfalls erkennbar, das Ausmaß ist jedoch deutlich geringer (Abbildung 3.19B).

Das für den CAB1 kodierende Gen ist unter Kontrollbedingungen um 2- (#4-5) bis 5-fach (#1-8) erhöht im Vergleich zur Expression im Wildtypen, sinkt jedoch bei 4 °C-Exposition auf ein zum Wildtyp vergleichbares Niveau (Abbildung 3.19C).

Wie bereits in Kapitel 3.2.1.5 festgestellt, zeigen auch *BvIMP2*-exprimierenden Pflanzen auch bezogen auf die Genexpression von Schlüsselkomponente zuckervermittelter Signalprozesse in der Tendenz dasselbe Verhalten, jedoch ist dieses in der Linie #1-8 verstärkt.

3.2.2.7 *BvIMP2* ist an der Regulierung des Langstreckentransports beteiligt

Die subzelluläre Zuckerverteilung spielt bei der Regulierung des Langstreckentransports eine entscheidende Rolle. Um den Einfluss des Transporters *IMP2* auf diesen Prozess beurteilen zu können, wurde die Expression des entsprechenden Gens in der Mittelrippe, der Blattspreite sowie der Petiole etwa gleich alter Blätter von Zuckerrüben ermittelt, welche entweder unbehandelt oder zwei, fünf bzw. sieben Tage bei 4 °C gehalten wurden. Unter Standardbedingung ist die Expression über die Blattkomponenten relativ gleich verteilt. Während diese in der Blattspreite durch den Kälteeinfluss etwas reduziert wird, steigt die Expression in der Petiole nach sieben Tagen Kälte auf annähernd das 5-fache verglichen zum Anfangswert (Abbildung 3.20A).

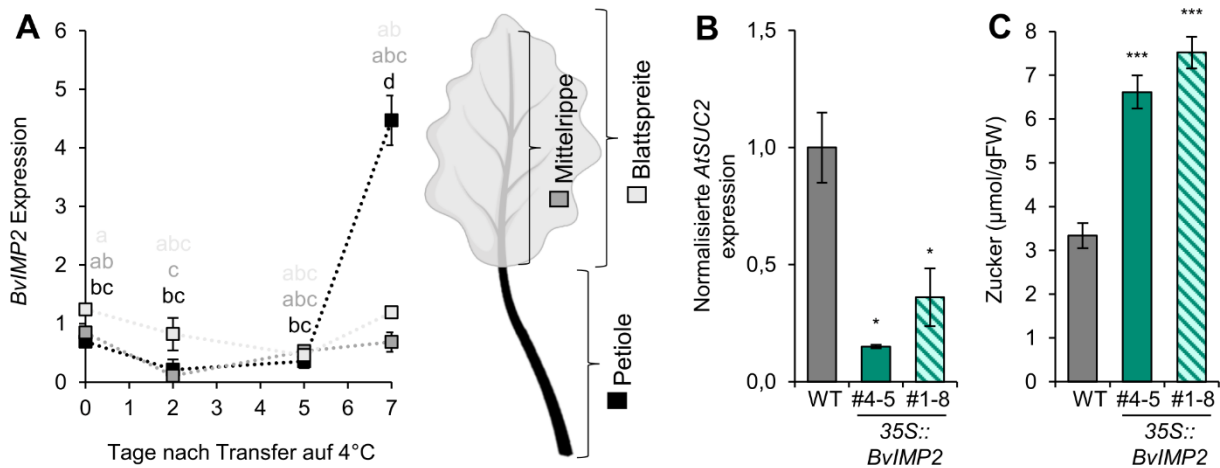


Abbildung 3.20 Auswirkungen einer veränderten Vakuolenbeladung auf den Langstreckentransport.

(A) Gewebe- und Temperatur-abhängige *BvIMP2*-Expression in Zuckerrüben-Sprossgewebe. Die Datenpunkte zeigen Mittelwerte von $n = 10$ Blättern $\pm$ SA. Signifikante Unterschiede wurden mittels zweifaktoriellem ANOVA mit anschließendem post-hoc Tukey-Test berechnet ($p \leq 0,05$). Mittelwerte, die keinen Buchstaben gemeinsam haben, sind signifikant unterschiedlich.

(B) Normierte *AtSUC2*-Expression in Wildtyp (grau), 35S::*BvIMP2*#4-5 (türkis) und #1-8-Arabidopsis-Rosetten (türkis-gestreift). Die Werte stellen Mittelwerte aus mindestens 4 biologischen Replikaten $\pm$ SA dar. Signifikante Unterschiede wurden mittels Student's *t*-Test berechnet ($p \leq 0,05$).

(C) Zuckergehalt der Phloem-Exsudate aus 6 Wochen alten Arabidopsis-Blättern des angegebenen Genotyps. Die Blätter wurden zur Mittagszeit geerntet und für 6 h im Dunkeln zur Exsudation belassen. Die Balken stellen die Mittelwerte aus 12 biologischen Replikaten $\pm$ SA dar, welche jeweils aus 4 Blättern von 2 individuellen Pflanzen bestehen. Signifikante Unterschiede wurden mittels Student's *t*-Test berechnet (* $p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,001$).

Weitergehend wurde geprüft, ob eine heterologe Expression von *BvIMP2* in Arabidopsis mit einer veränderten Transportrate im Langstreckentransport einhergeht. Trotz einer um 85 (#4-5) bzw. 64% (#1-8) verringerten Expression des Phloem-Belader-Gens *SUC2* in den 35S::*BvIMP2*-Linien, führt diese dennoch zu einer um 2- (#4-5) bzw. 2,3-fach (#1-8) erhöhten Zuckerabundanz im über sechs Stunden gesammelten Phloemexsudat.

3.2.2.8 Die *BvIMP2*-Expression ist in assimilierenden Blättern erhöht und konsumierenden Blättern reduziert

Scheinbar hat der vakuoläre Zucker-Belader *BvIMP2* eine direkte Auswirkung auf den Langstreckentransport. Besonders in andauernden Kälteperioden ist die Expression des entsprechenden Gens vergleichsweise hoch. Um genauer ermitteln zu können in welche Prozesse der Transporter verwickelt ist bzw. welche durch dessen Aktivität gefördert oder beeinträchtigt werden, wurde eine Situation geschaffen, in welcher deutlich zwischen assimilierenden und konsumierenden Blättern unterschieden werden kann.

Hierfür wurden intakte Zuckerrüben für sechs Wochen unter Standardbedingungen angezogen, um anschließend alle Blätter bis auf ein weiterhin illuminiertes Blatt abzudunkeln. Daraufhin wurde die *BvIMP2*-Expression und die Gehalte an Glukose, Fruktose und

Saccharose über einen Zeitraum von 32 Stunden gemessen. Zudem wurde die Expression eines am Langstreckentransport wichtigen Transporters *BvSUT1* gemessen. Alle Werte wurden auf die unbehandelten Pflanzen normiert und das Verhältnis zur Basis 2 logarithmiert.

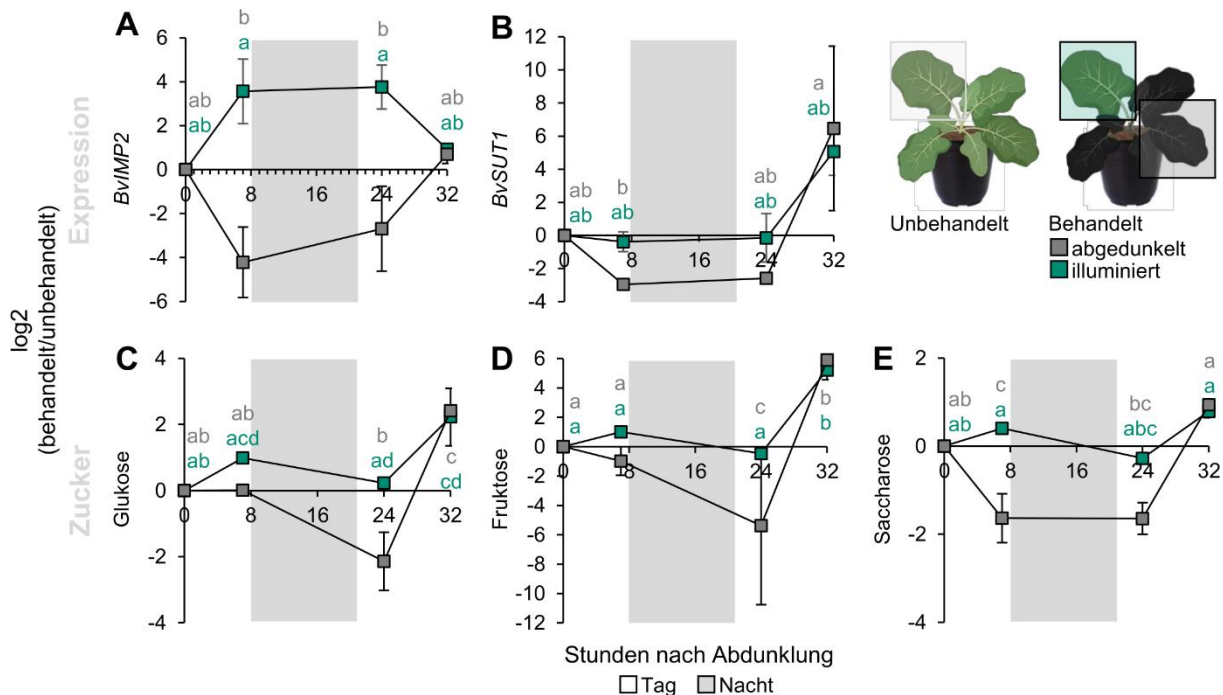


Abbildung 3.21 Expression und Zuckerdynamik nach Blattabdunkelung.

Logarithmus des Verhältnisses von Blättern dunkel behandelter zu unbehandelten Zuckerrüben zur Basis 2 der *BvIMP2*- (A) sowie *BvSUT1*-Expression (B) als auch des Glukose- (C), Fruktose- (D) und Saccharose-Gehalts (E). Behandelten Pflanzen wurde je das einzige belichtete (türkis) sowie ein dunkel gehaltenes (grau) *Source*-Blatt entnommen. Die Werte stellen Mittelwerte aus mindestens $n = 4$ biologischen Replikaten $\pm$ SA dar. Signifikante Unterschiede wurden mittels zweifaktoriellem Anova mit anschließendem post-hoc Tukey-Test berechnet ($p \leq 0,05$). Mittelwerte, die keinen Buchstaben gemeinsam haben, sind signifikant unterschiedlich.

Photosynthetisch aktive Blätter zeigen nach Abdunklung der restlichen Blätter einen äußerst hohes *BvIMP2*-Expressionslevel vergleichen zu unbehandelten Blättern. Komplementär dazu verhält sich der abgedunkelte Teil des Sprosses, welches einen ähnlich hohen Ausschlag jedoch ins Negative aufweist. Nach 32 Stunden gleicht sich das Expressionsniveau in den unterschiedlich behandelten Blättern erneut an.

In dunkel gehaltenen Blättern ist ebenfalls die *BvSUT1*-Expression deutlich reduziert, jedoch bleibt diese in illuminierten Blättern ähnlich verglichen mit unbehandelten Pflanzen. Lediglich nach einer Dunkelphase von 32 Stunden stieg die Expression auf einen Log2-fache Änderung von 5-6.

Während die Zuckergehalte in abgedunkelten Teilen des Sprosses abnehmen, steigen diese tendenziell in belichteten Blättern. Der Verlust ist vor allem nach 24 Stunden deutlich, wohingegen die Anhäufung in den assimilierenden Blättern schon nach 8 Stunden auftritt und

sich nach 24h wieder dem Ursprungszustand annähert. Das Level aller drei Spezies erlangt nach 32 Stunden ihren Höhepunkt, sowohl in un- als auch belichteten Blättern.

3.2.2.9 Ein erhöhter vakuolärer Zucker-Gehalt ist trotz verzögerten Schossens vorteilhaft für die Infloreszenzlänge

Um zu Überprüfen ob eine veränderte *BvIMP2*-Expression nicht nur einen Einfluss auf die subzelluläre sowie gesamtpflanzliche Zuckerverteilung hat, sondern auch das Blühverhalten beeinflusst, wurden verschiedene Marker für die Blühentwicklung quantifiziert.

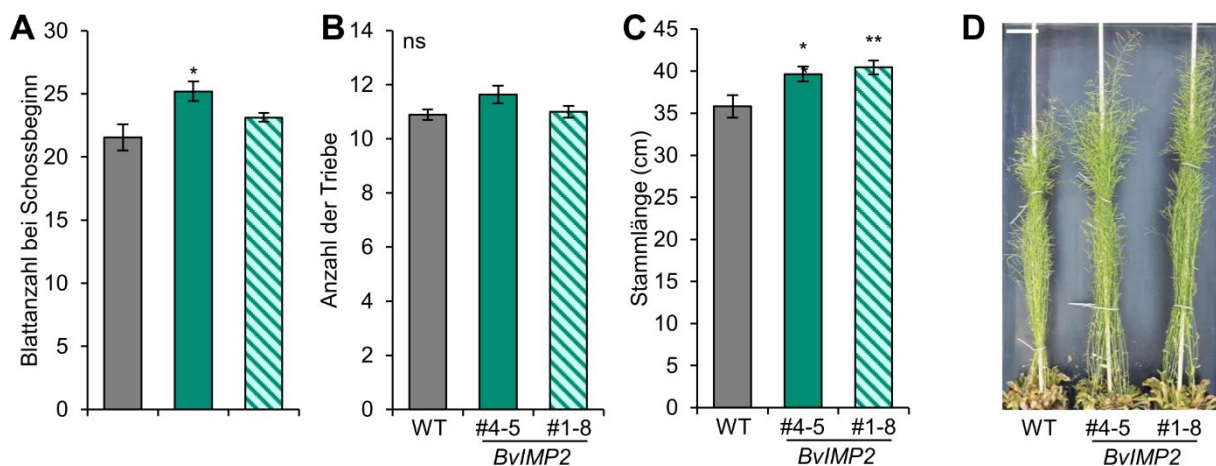


Abbildung 3.22 Analyse der Blütenstand-Entwicklung.

(A) Blattzahl bei Schossbeginn. (B) Anzahl der Triebe zum Zeitpunkt der Stammlängen-Messung. (C) Bestimmung der gesamten Sprosslänge. (D) Photographische Abbildung repräsentativer *BvIMP2*-Expressionslinien (türkis) sowie des korrespondierenden Wildtypen (grau) zum Zeitpunkt der Bestimmung der gesamten Sprosslänge. Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens $n = 5$ für (C) und 17 für (A) und (B) biologischen Replikaten $\pm$ SA. Signifikante Unterschiede wurden mittels Student's *t*-Test berechnet (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$).

Scheinbar führt eine unikutäre Expression des vakuolären Zucker-Belader-Gens *BvIMP2* zu einem verzögerten Blühbeginn. Demnach beginnt eine solche Pflanze erst bei Vorhandensein von im Schnitt 24 Blättern mit der Sprossentwicklung, während der Wildtyp schon mit 22 entwickelten Blättern zu schossen beginnt (Abbildung 3.22A). Die beobachtete Verzögerung im Blühbeginn spiegelt sich jedoch nicht in der gesamten Blühentwicklung wider. Die Genotypen unterscheiden sich zwar nicht in der Anzahl an Infloreszenztrieben (Abbildung 3.22B), jedoch ist die maximale Infloreszenzlänge um 10 (#4-5) bzw. 11% (#1-8) erhöht, verglichen zum Wildtyp (Abbildung 3.22C und D).

3.2.2.10 BvIMP2-Expressoren zeigen reduzierte Ionen-Gehalte, während der Nitrat-Gehalt unter Kältebedingungen ansteigt

Es wurde bereits festgestellt, dass die Abundanz bzw. Veränderung im Ionengehalt ebenfalls Hinweise auf den Status des Langstreckentransports bieten können. Demnach wurden sowohl Gehalte einzelner Kationen- als auch Anionen-Spezies der drei verschiedenen Genotypen analysiert.

Bei Betrachtung der Kationengehalte fällt zunächst auf, dass die Werte der BvIMP2-exprimierenden Pflanzen bei Standardbedingungen zumeist unter denen des Wildtypen liegen. Nach Eintritt der Kälteeinwirkung ist keiner Unterscheidung der Genotypen mehr möglich.

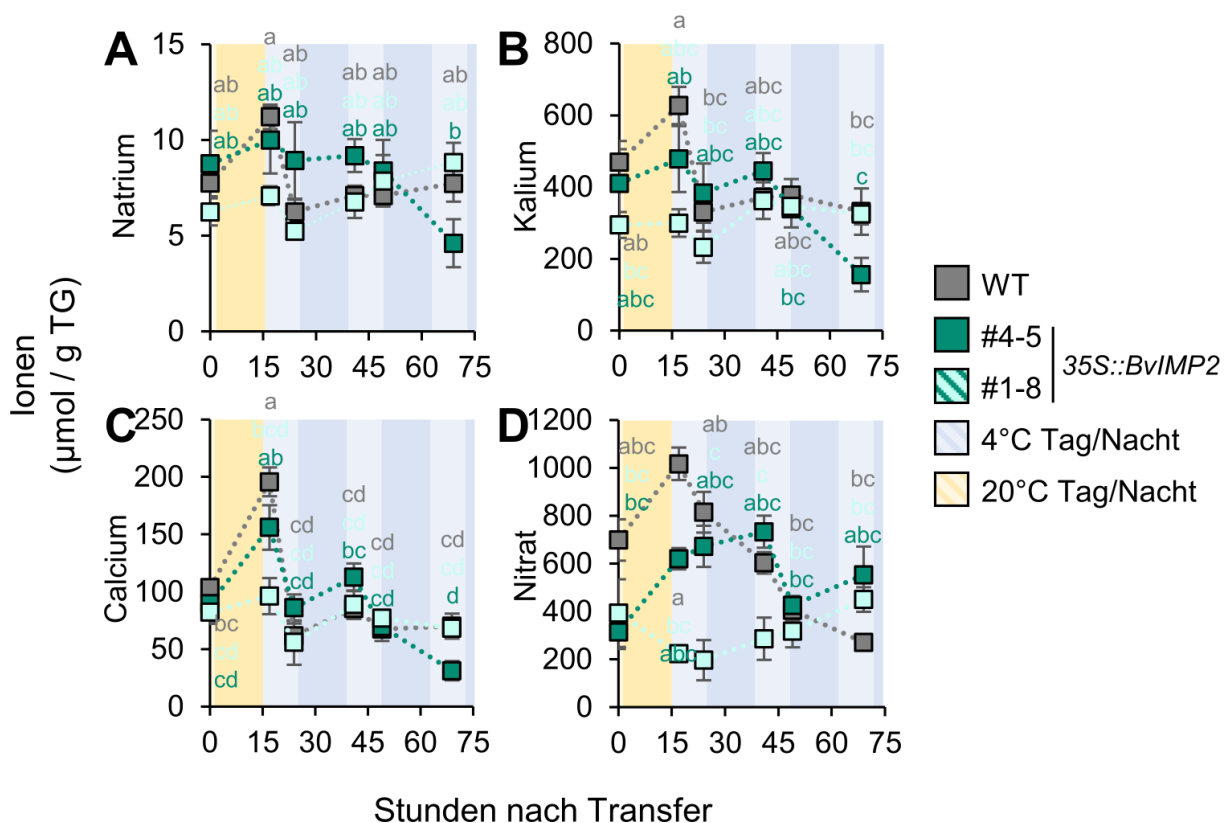


Abbildung 3.23 Ionen-Gehalt kältebehandelter Arabidopsis-Rosetten.

Dargestellt ist der Natrium- (A), Kalium- (B), Calcium- (C) und Nitrat-Gehalt (D) kältebehandelter BvIMP2-Expressionslinien (türkis) sowie des korrespondierenden Wildtypen (grau). Die Datenpunkte zeigen Mittelwerte von n = 12 (t=0) oder 4 (t=17-72) Pflanzen ± SA. Signifikante Unterschiede wurden mittels zweifaktoriellem ANOVA mit anschließendem post-hoc Tukey-Test berechnet ($p \leq 0,05$). Mittelwerte, die keinen Buchstaben gemeinsam haben, sind signifikant unterschiedlich.

Dies trifft ebenfalls für die Anionen-Gehalte zu. Demnach liegt der Anionen-Gehalt in den BvIMP2-exprimierenden Pflanzen die meiste Zeit unter dem des Wildtypen, während die Gehalte der BvSUT4-exprimierenden Pflanzen zumindest leicht darüber liegen. Besonders zum ersten Messzeitpunkt liegen die Werte der Mutanten deutlich unter denen des Wildtypen.

Der Gehalt des im Wildtyp gemessenen Nitrats steigt über Nacht an und sinkt nach Eintritt der 4 °C-Phase konstant ab. Im Gegensatz dazu starten die *BvIMP2*-exprimierenden Pflanzen bei einem deutlich geringeren Ausgangswert, jedoch steigen die Gehalte tendenziell über die Kälteperiode an.

3.2.2.11 Der Citrat-Zyklus ist abhängig von der subzellulären Zuckerverteilung

Um feststellen zu können, ob die Carbonsäure-Gehalte durch die subzelluläre Umverteilung der Zucker beeinflusst sind, wurde der Gehalt an Intermediaten des Citrat-Zyklus quantifiziert.

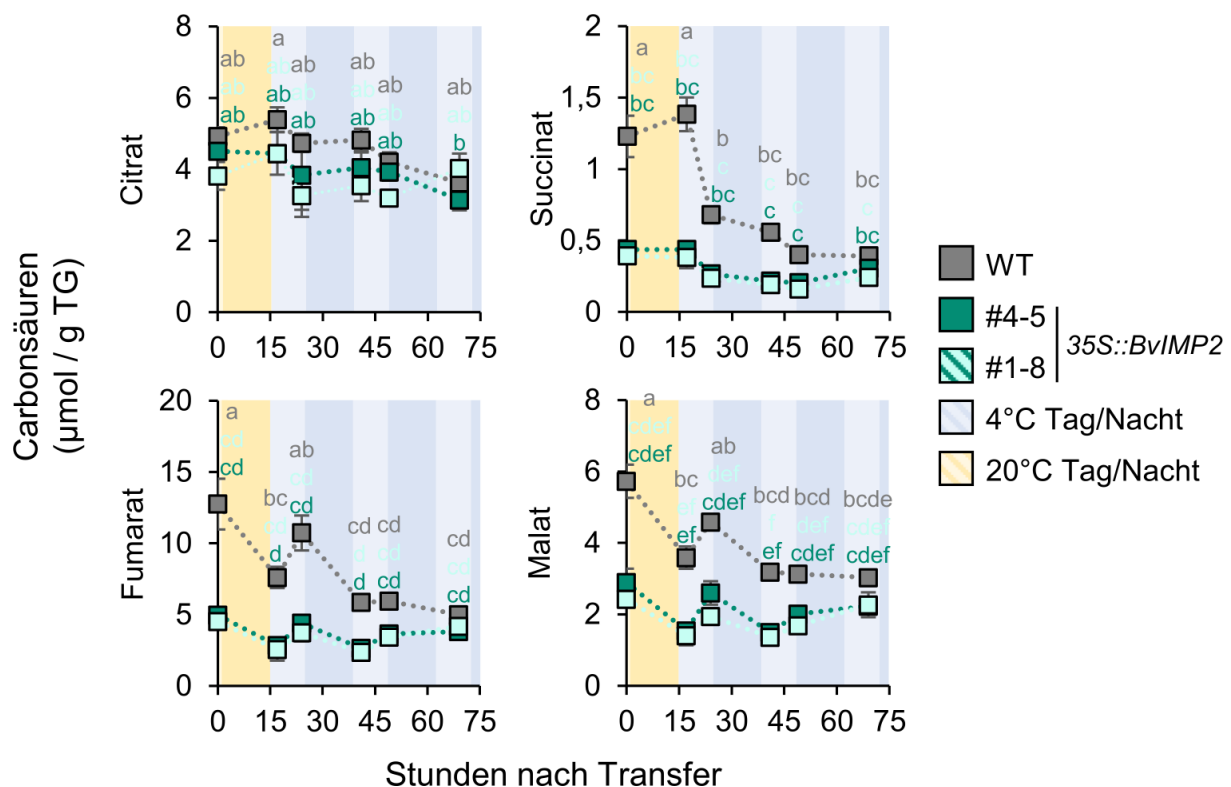


Abbildung 3.24 Carbonsäure-Gehalt kältebehandelter Arabidopsis-Rosetten.

Dargestellt ist der Citrat- (A), Succinat- (B), Fumarat- (C) und Malat- (D) Gehalt kältebehandelter *BvIMP2*-Expressionslinien (türkis) sowie des korrespondierenden Wildtypen (grau). Die Datenpunkte zeigen Mittelwerte von $n = 12$ ($t=0$) oder 4 ($t=17-72$) Pflanzen $\pm$ SA. Signifikante Unterschiede wurden mittels zweifaktoriellem ANOVA mit anschließendem post-hoc Tukey-Test berechnet ($p \leq 0,05$). Mittelwerte, die keinen Buchstaben gemeinsam haben, sind signifikant unterschiedlich.

Beginnend mit Citrat ist zu beobachten, dass dessen Gehalt in den betrachteten Mutanten über den gesamten Zeitverlauf, sowohl unter Standard- als auch Kältebedingungen, stets minimal unter dem des Wildtypen liegt (Abbildung 3.24A).

Das nächste Substrat im Citrat-Zyklus, Succinat, weist bereits unter Standardbedingungen deutliche Unterschiede zum Wildtypen auf. Der Succinat-Gehalt sowohl der Linie #1-8 als auch #4-5 liegt mit $0,5 \mu\text{mol} / \text{gTG}$ markant unter dem des Wildtypen, mit einem Mittelwert von $1,25 \mu\text{mol} / \text{gTG}$. Der Succinat-Gehalt sinkt in den Mutanten nur leicht, während dieser im Wildtypen

unmittelbar nach Kälteexposition bereits um die Hälfte abfällt und sich gegen Ende der Aufzeichnung dem der BvIMP2-Mutante annähert (Abbildung 3.24B).

Ähnlich verhält es sich für die Gehaltsmessung der nachfolgenden Carbonsäuren Fumarat und Malat (Abbildung 3.24C und D). Der wesentliche Unterschied besteht darin, dass der Gehalt am Abend höher als der am Morgen ist, hingegen das Succinat- als auch Citrat-Level am Morgen höher ausfällt.

3.2.3 Untersuchung der kälteinduzierten Änderung des Mono- zu Disaccharid-Verhältnisses durch Expression von *AtTST1* in Zuckerrüben-Pfahlwurzeln

Nachdem primäre Analysen einer heterologen Expression vakuolärer Zuckerrüben-Transporter in *Arabidopsis* bereits erste Anzeichen darauf geben, dass eine Optimierung des vakuolären Entladungsstatus zu einem veränderten Langstreckentransport führt und demnach in der Generierung einer kältetoleranten Zuckerrübe münden könnte, wurde ebenfalls die Auswirkung einer heterologen Expression eines tonoplastidären Transporter aus *Arabidopsis* in der Zuckerrübe selbst untersucht.

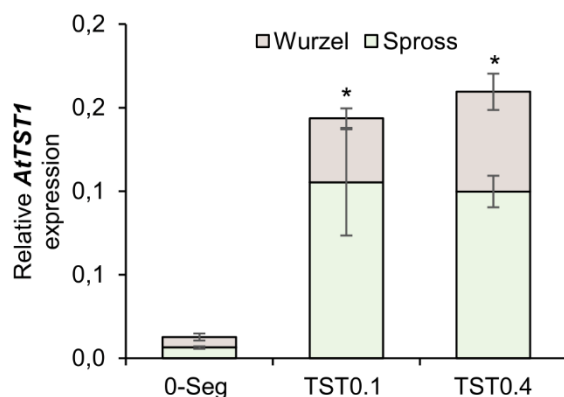


Abbildung 3.25 Expressionsanalysen.

Dargestellt ist die *AtTST1*-Expression in Pfahlwurzel und Blättern der betrachteten Genotypen. Die heterologe Expression des Transporters ist sowohl im Spross (grün) als auch in der Wurzel (braun) messbar. Die Balken stellen den Mittelwert von drei biologischen Replikaten $\pm$ SA dar. Signifikante Unterschiede zwischen den transgenen Pflanzen zur 0-Segregante wurde mittels Student's *t*-Test berechnet (* $p \leq 0,05$).

Der **TONOPLAST SUGAR TRANSPORTER 1** (*AtTST*) aus der frosttoleranten Pflanze *Arabidopsis thaliana* vermittelt einen kälteabhängigen Import von Zuckern in die Vakuole (Wormit *et al.*, 2006). Demzufolge handelt es sich hierbei um einen geeigneten Kandidaten zur Expression in Zuckerrübe (*Beta vulgaris*) um sodann den Effekt einer potenziell erhöhten vakuolären Zucker-Konzentration auf das Frostverhalten der Pflanze zu untersuchen. Zu diesem Zweck stellte die KWS SAAT SE & Co KGaA zwei Hybride (*TST0.1* und *TST0.4*) zur Verfügung, welche einen erhöhten Transkriptgehalt des *AtTST1* aufweisen. Dabei ist vorwiegend die mRNA-Menge im Blatt, jedoch auch in der Pfahlwurzel, verglichen mit der 0-Segregante erhöht (Abbildung 3.25).

Die Betrachtung des Trockengewichts sowie des Wassergehalts von Zuckerrüben während einer einwöchigen Akklimatisierung bei 12 °C, gefolgt von einer fünföchigen Kälteanzucht bei 4 °C, lieferten keine markanten Unterschiede der Genotypen zu. Sowohl die 0-Segregante

als auch die analysierten Hybride akkumulieren weiter Biomasse und verlieren Wasser als Antwort auf die Kälte, wobei sowohl das Frisch- als auch Trockengewicht in Wildtyp-Rüben an den ersten beiden Messzeitpunkten unmittelbar nach Kälteeintritt um bis zu 1,29 g (TST0.1/FG/t=10) höher ausfällt als das der Hybride (Abbildung 3.26A bis C).

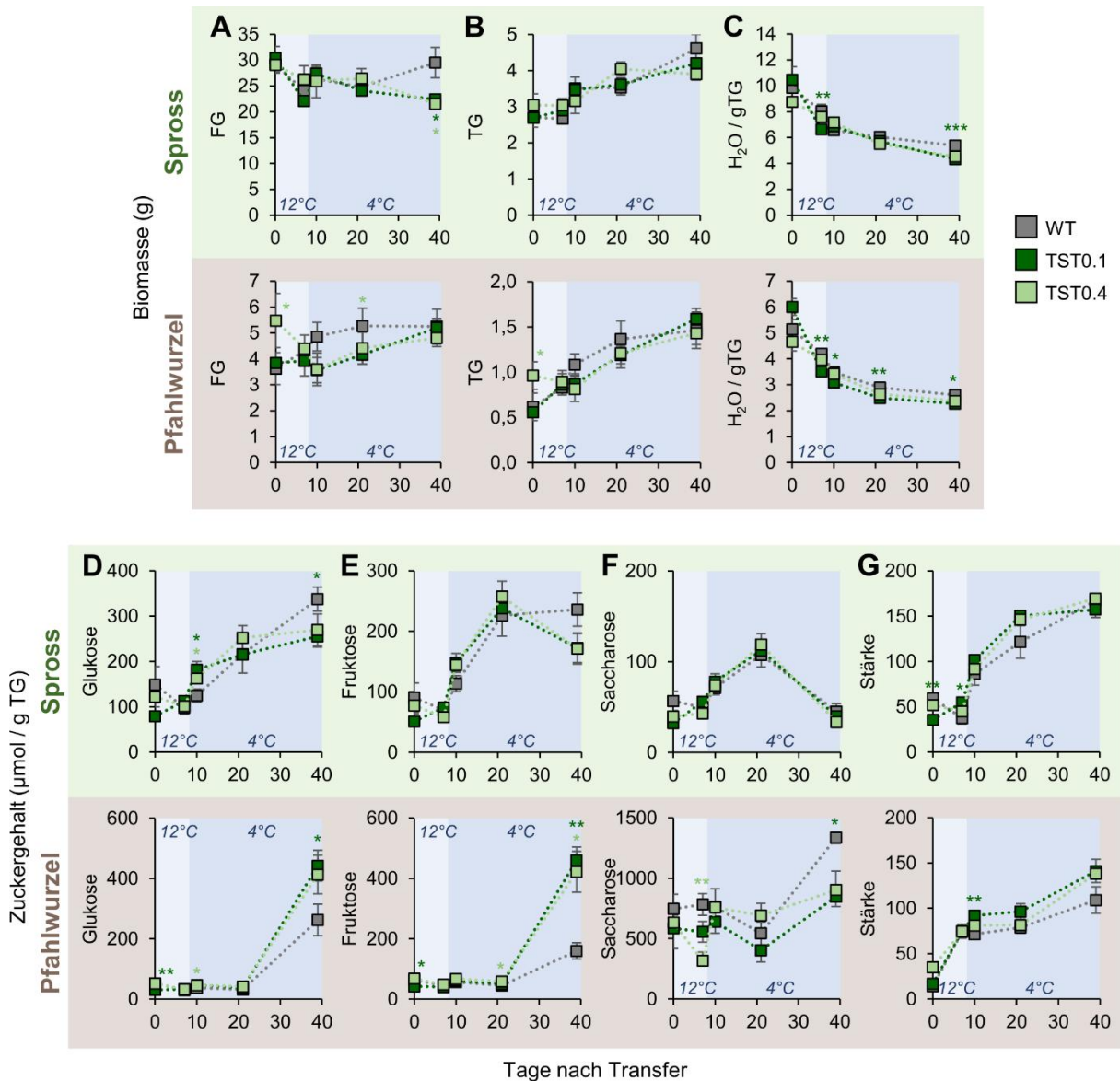


Abbildung 3.26 Biomasse und Zuckergehalt kältebehandelter Zuckerrübenblätter und Pfahlwurzeln.

(A) bis (C) Verhalten von Blättern und Pfahlwurzeln drei verschiedener Zuckerrübengenotypen unterschiedlicher *AtTST1*-Expression auf kalte Temperaturen. Die Aufzeichnung der Biomasse und der Zuckerakkumulation erfolgte zeitgleich mit der 4 °C-Behandlung. Frischgewicht (FG) (A), Trockengewicht (TG) (B), Wassergehalt (H_2O/gTG) (C) von Blättern und Wurzeln.

(D) bis (G) Gehalt an Glukose (D), Fruktose (E), Saccharose (F) und Stärke (G) in Blättern bzw. Pfahlwurzeln im Verlauf der Kälteperiode (4 °C). Die Datenpunkte zeigen Mittelwerte von $n = 4$ bis 6 Pflanzen $\pm$ SA. Signifikante innerhalb der Genotypen sowie der Zeitpunkte wurden mittels Student's *t*-Test berechnet (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$).

Tatsächlich akkumulierten die Hybrid-Linien nach Kälteeinwirkung mehr Monosaccharide in der Pfahlwurzel als der korrespondierende Wildtyp, welcher jedoch etwas höhere Saccharose-Gehalte aufwies. Aufgrund der effizienten Sequestrierung der Zucker in Form von

Monosacchariden in Wurzelvakuolen, konnte trotz kälteinduzierter *Sink-Source*-Umkehr weniger Zucker in den Spross der Hybridpflanzen transportiert werden (Abbildung 3.26D bis F). Anders als bei den in Kapitel 3.1.2 analysierten Pflanzen, steigt der Stärke-Gehalt bei Kälteexposition sowohl in den Pfahlwurzeln, vorwiegend jedoch in den Blättern aller betrachteten Genotypen. Der Effekt ist in den Hybriden etwas stärker ausgeprägt (Abbildung 3.26G).

3.2.3.2 Ein erhöhter vakuolärer Zucker-Gehalt unterstützt in Pfahlwurzeln den vorteilhaften Effekt einer Kälteakklimatisierung auf die Frosttoleranz

Eine eventuelle kälteprotektive Wirkung der vakuolär gespeicherten Monosaccharide in den Wurzeln der Hybrid-Linien konnte durch die Messung der Elektrolytleitfähigkeit verschiedener Gewebe nach Frosteinwirkung verifiziert werden (Abbildung 3.27A). Die elektrische Leitfähigkeit stellt ein Maß für die Integrität von biologischen Membranen dar. Je höher der Wert desto permeabler ist die Membran. Gemessen wurden die Werte nach einer zweitägigen Frostbehandlung bei -5°C . Nach einer darauffolgenden Erholungsphase wurden photographische Aufnahmen angefertigt. Zumindest die Hybride TST0.1 scheint sich vom Frost zu erholen, während der Wildtyp als auch die TST0.4-Linie dem Frost nicht standhalten konnten (Abbildung 3.27B). Bei TST0.1 handelt es sich um dieselbe Linie, die auch im autotrophen Gewebe einen verminderten reduzierten Elektrolyt-Austritt aufweist.

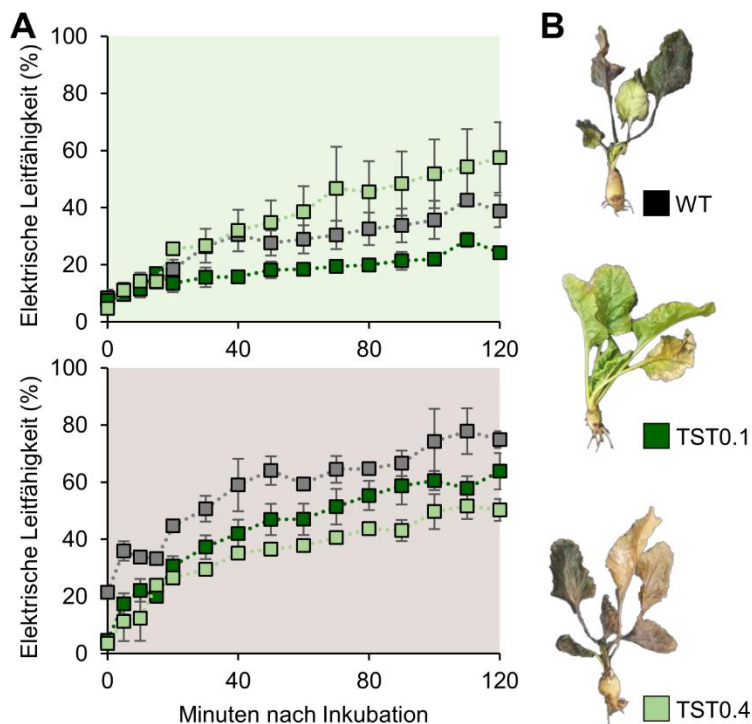


Abbildung 3.27 Frostanalysen.

(A) Elektrolytverlust von Hybrid- (grün) und den korrespondierenden Wildtyp-Zuckerrüben (grau) in Spross- (oben) und Wurzelgewebe (unten). (B) Repräsentative Aufnahme von Hybrid- (grün) und den korrespondierenden Wildtyp-Zuckerrüben (schwarz), welche nach 48h Frost (-5°C) zur Erholung auf 20°C gestellt wurden.

Eine detailliertere Betrachtung des zur Messung der Elektrolytleitfähigkeit verwendeten Mediums offenbart Verhältnis der intrazellulären Zucker. Demnach ist in den betrachteten Geweben des zuvor frosttoleranten Genotypen TST0.1, im Vergleich zu den anderen

Genotypen, ein geringerer Saccharose-Verlust zu verzeichnen. Zudem ist auch der Verlust an Monosacchariden im Blattgewebe des Genotyps reduziert (Abbildung 3.28).

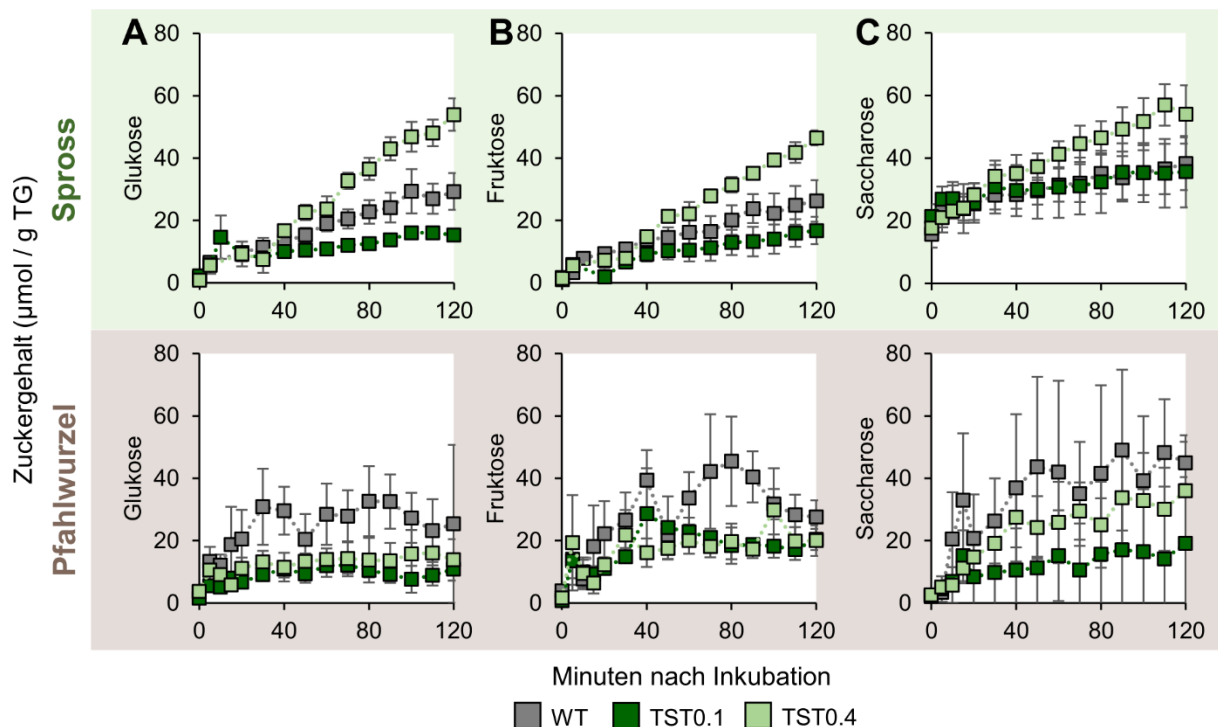


Abbildung 3.28 Zucker-Komposition der frostbedingt austretenden Flüssigkeit.

Elektrolytverlust von Hybrid- (grün) und den korrespondierenden Wildtyp-Zuckerrüben (grau) in Spross- (oben) und Wurzelgewebe aufgetrennt nach Zuckerspezies. (A) Glukose, (B) Fruktose, (C) Saccharose.

3.2.4 Analyse einer pfahlwurzel-spezifischen *BvTST2;1*-Expression in *Beta vulgaris*

Im vorherigen Kapitel konnte gezeigt werden, dass sich eine Aktivierung des Zucker-Imports in die Vakuole positiv auf die Kältetoleranzentwicklung der Pfahlwurzel auswirkt. Das autotrophe Gewebe reagierte jedoch sensibler. Demzufolge wurde eine weitere Gruppe an Hybriden hinsichtlich ihrer Zucker-Komposition untersucht, welches den endogenen Rüben-Transporter *TST2;1* wurzelspezifisch vermehrt exprimiert.

Der Tonoplast Sugar Transporter 2;1 (*BvTST2;1*) aus *Beta vulgaris* vermittelt den Import von Saccharose in die Pfahlwurzelvakuole und ist damit für die Fähigkeit der Pflanze verantwortlich, Saccharose in außerordentlich hohen Mengen zu akkumulieren. Die in Kapitel 3.1 präsentierten Daten zeigen, dass kalte Temperatur eine Umkehrung des Verhältnisses von Saccharose-konsumierenden zu -lieferenden induziert, was zu einer Richtungsänderung des Flusses im Langstreckentransportsystem und damit zu einem Verlust von in der Pfahlwurzel gespeichertem Zucker führt. Da die Herunterregulierung des *BvTST2;1* einen Schlüsselprozess darstellt, der die zuvor beschriebene Umsteuerung der Zuckerflüsse bestimmt, liegt die Vermutung nahe, dass eine pfahlwurzel-spezifische Überexpression die

kälteaktivierte Remobilisierung von vakuolär gespeicherten Zuckern unterbinden könnte. Um den Effekt einer solchen Überexpression auf das Kälteverhalten der Pflanzen zu untersuchen, lieferte die KWS SAAT SE & Co KGaA sechs Hybride, die mit einem Codon-optimierten Genkonstrukt des *BvTST2;1* transfiziert wurden. Um eine gewebespezifische Expression dieser *TST2;1*-Version zu erreichen, wurde das Konstrukt unter die Kontrolle eines pfahlwurzel-spezifischen Promoters namens 2-1-48 gebracht (Oltmanns *et al.*, 2006).

Bereits in der Expression des endogenen *BvTST2;1* sind Genotyp-abhängige Unterschiede zu verzeichnen. Während annähernd alle Genotypen (außer GT8706) ein erhöhtes *BvTST2;1*-Transkriptlevel im Blatt im Vergleich zur 0-Segregante (Genotyp 8748) zeigen, ist dieses Level nur im Wurzelgewebe der Genotypen 8707, 8762 und 8763 erhöht (Abbildung 3.29A). Besonders bei Betrachtung der Expression beider Gewebe zueinander, scheint die Hybrid-Linie 8706 mit einer relativ hohen *BvTST2;1*-Expression in der Wurzel und die Hybrid-Linien 8708, 8709 und 8062 mit einer relativ hohen *BvTST2;1*-Expression im Sprossgewebe von Interesse zu sein.

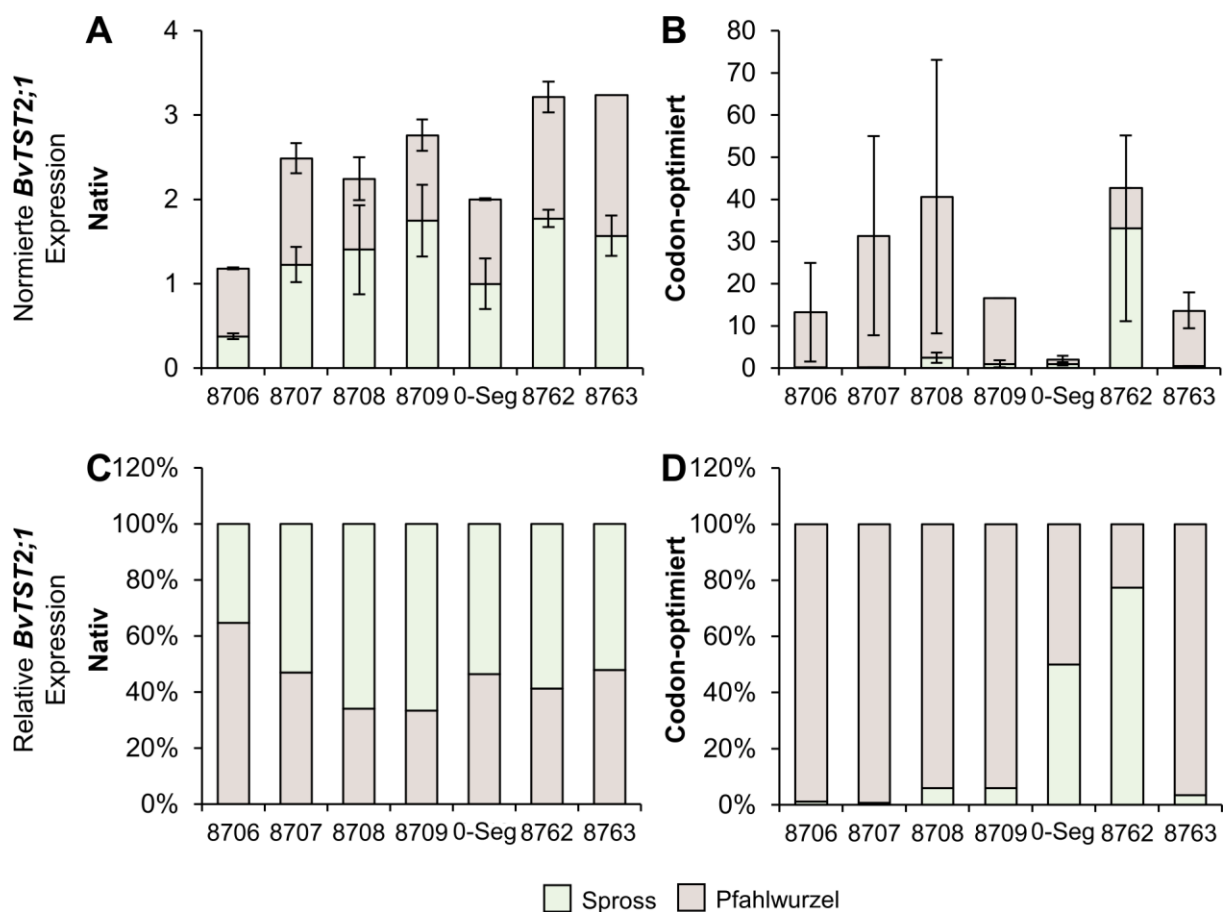


Abbildung 3.29 Gewebsspezifische *BvTST2;1*- Expression.

Dargestellt ist die auf die 0-Segregante normierte (A) und (B) sowie die relative (C) und (D) Expression des nativen (A) und (C) und des Codon-optimierten (B) und (D) *BvTST2;1* in Zuckerrüben-Pfahlwurzeln (braun) und Blättern (grün). Die Balken stellen den Mittelwert von drei biologischen Replikaten ± SA dar.

Aufschlussreich ist jedoch erst die Betrachtung der Expression des codon-optimierten *BvTST2;1*. Alle Hybride zeigen eine höhere Expression im Wurzelgewebe verglichen zum Wildtypen. Auffällig ist zudem die relativ hohe Expression der codon-optimierten Transporter-Variante im Sprossgewebe der 8762-Linie.

3.2.4.2 Die *BvTST2;1*-Expression reguliert eine kälteverstärkte Verschiebung des Mono- zu Disaccharid-Verhältnisses

Um Einblicke in das physiologische Verhalten von Pflanzen zu erhalten, die eine stärkere *BvTST2;1*-Expression aufweisen, wurde basierend auf der Expressionsanalyse in Abbildung 3.29 zunächst der Zucker-Gehalt der Genotypen 8707 und 8708 im Vergleich zur 0-Segregante analysiert. Ausgehend von der Beobachtung der Zuckerzusammensetzung des Wurzelgewebes ist zu erkennen, dass die besonders markanten Unterschiede zwischen den Genotypen nach der Frostphase auftreten. Überraschenderweise akkumulierten die Hybriden mit einem erhöhten *BvTST2.1*-Transkriptgehalt zu diesem Zeitpunkt mehr Monosaccharide als Saccharose, demnach liegt das Mono- zu Disaccharid-Verhältnis in den Hybriden mit einem Wert von 17,6 (8707) und 9,8 (8708) im Mittel 9,1-fach erhöht im Vergleich zur 0-Segregante, welche lediglich einen Wert von 1,5 erreicht (Abbildung 3.30B). Durch einen weiteren Blick auf die Gehalte der einzelnen Zucker-Spezies wird deutlich, dass das steigende Verhältnis nach Frosteinwirkung sowohl durch einen Glukose- aber vermehrt durch eine Fruktose-Akkumulation und nur sekundär durch eine Reduktion im Saccharose-Gehalt begründet ist. Die Zuckerzusammensetzung des Sprossgewebes reagiert zwar auch mit einer leichten Monosaccharid-Akkumulation und einer stärkeren Reduktion des Saccharose-Gehalts, jedoch ist kaum ein Unterschied zwischen den Genotypen zu erkennen. Das autotrophe Gewebe reagiert demnach indifferent auf die starken Anpassungen im Wurzelgewebe der Zuckerrübe (Abbildung 3.30C bis E).

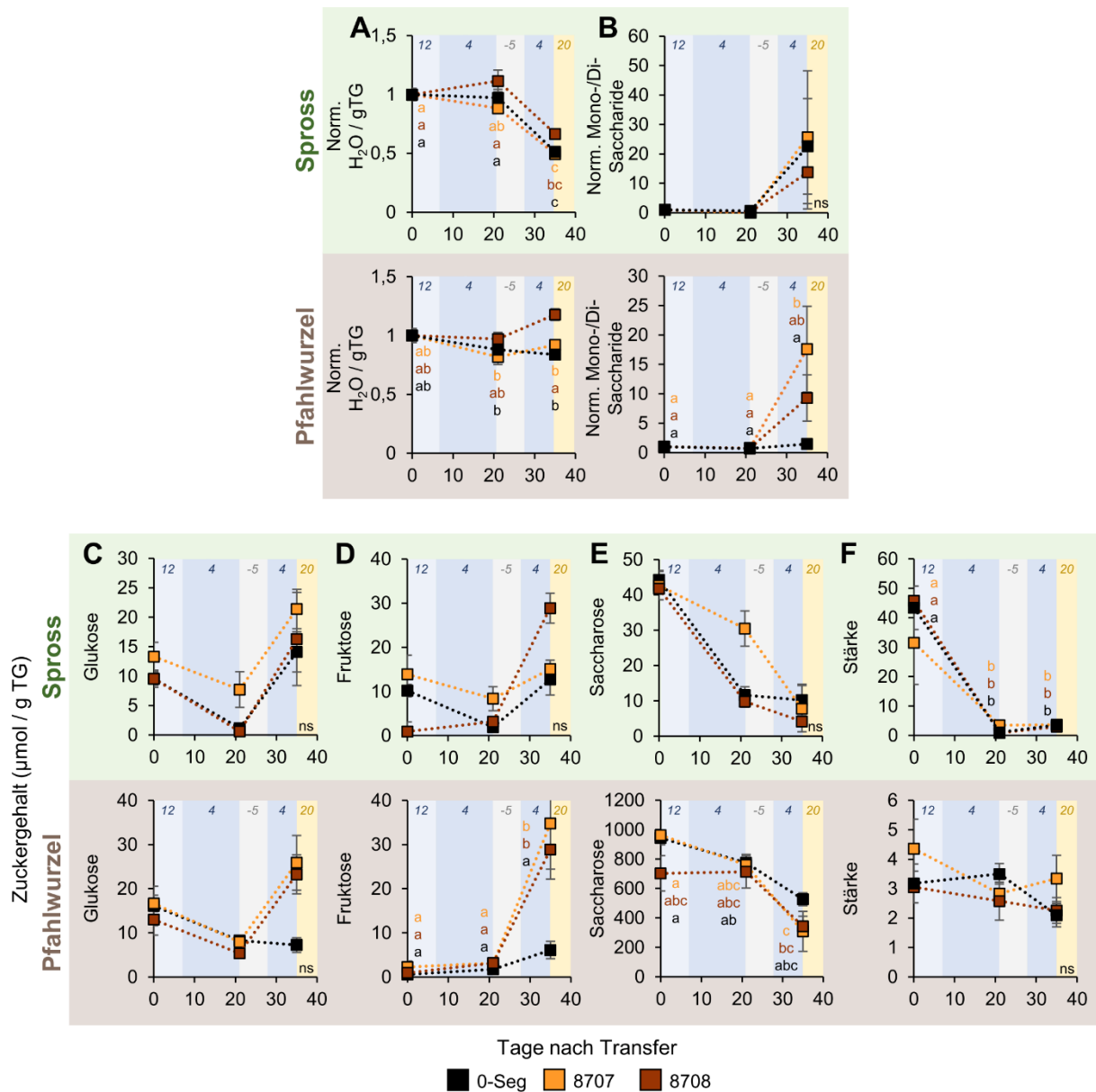


Abbildung 3.30 Wasser und Zuckergehalt kältebehandelter Zuckerrübenblätter und Pfahlwurzeln.

(A) und (B) Verhalten von Blättern und Pfahlwurzeln drei verschiedener Zuckerrüben genotypen unterschiedlicher *BvTST2;1*-Expression auf kalte Temperaturen. Die Aufzeichnung der Biomasse und der Zuckerakkumulation erfolgte zeitgleich mit der 12 °C-Behandlung. Normierter Wassergehalt (H_2O/gTG) (A), Normiertes Mono- zu Disaccharid-Verhältnis (B) von Blättern und Wurzeln. (D) bis (G) Gehalt an Glukose (D), Fructose (E), Saccharose (F) und Stärke (G) in Blättern bzw. Pfahlwurzeln im Verlauf der Kälteperiode. Die Datenpunkte zeigen Mittelwerte von $n = 4$ bis 6 Pflanzen $\pm$ SA. Signifikante innerhalb der Genotypen sowie der Zeitpunkte wurden mittels zweifaktoriellem ANOVA mit post-hoc Tukey Test berechnet ($p \leq 0,05$). Mittelwerte, die keinen Buchstaben gemeinsam haben, sind signifikant unterschiedlich. ns, nicht signifikant

Wie bereits bei den in Kapitel 3.1 verwendeten Zuckerrüben-Linien ist auch in den hier analysierten Pflanzen eine starke Reduktion des Stärke-Gehalts bereits nach der ersten 4 °C-Phase zu erkennen. Dieser sinkt von einem durchschnittlichen Anfangswert von 40,2 $\mu mol/gTG$ auf einen Durchschnittswert von 3,0 $\mu mol/gTG$ (Abbildung 3.30F). Eine

ebenfalls bekannte Beobachtung ist die leichte Minimierung des Wassergehalts auf etwa die Hälfte des initialen Gehalts (Abbildung 3.30A).

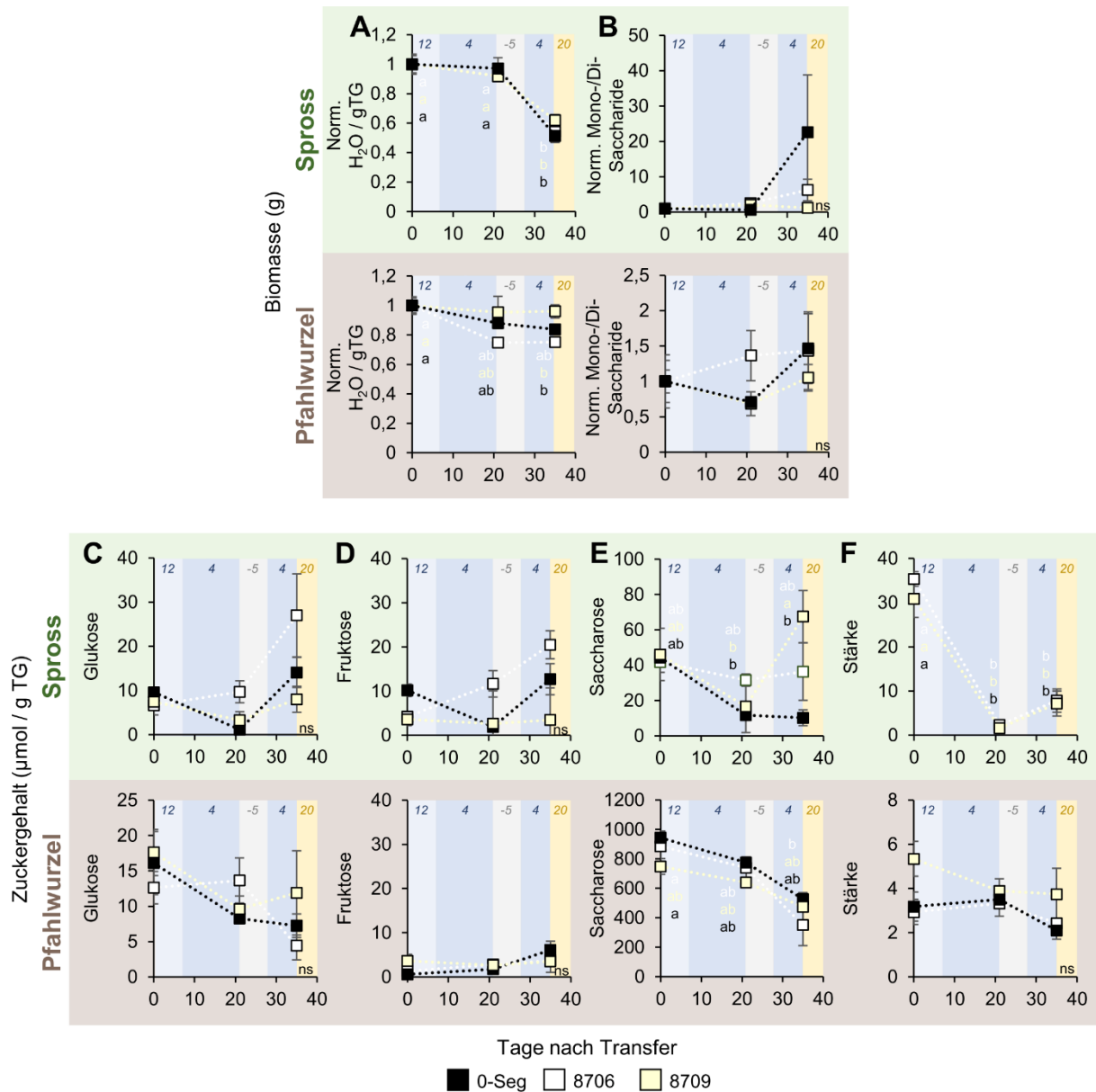


Abbildung 3.31 Wasser und Zuckergehalt kältebehandelter Zuckerrübenblätter und Pfahlwurzeln.

(A) und (B) Verhalten von Blättern und Pfahlwurzeln drei verschiedener Zuckerrübengenotypen unterschiedlicher *BvTST2;1*-Expression auf kalte Temperaturen. Die Aufzeichnung der Biomasse und der Zuckerakkumulation erfolgte zeitgleich mit der 12 °C-Behandlung. Normierter Wassergehalt (H₂O/gTG) (A), Normiertes Mono- zu Disaccharid-Verhältnis (B) von Blättern und Wurzeln. (D) bis (G) Gehalt an Glukose (D), Fruktose (E), Saccharose (F) und Stärke (G) in Blättern bzw. Pfahlwurzeln im Verlauf der Kälteperiode. Die Datenpunkte zeigen Mittelwerte von n = 4 bis 6 Pflanzen ± SA. Signifikante Änderungen innerhalb der Genotypen sowie der Zeitpunkte wurden mittels zweifaktoriellem ANOVA mit post-hoc Tukey Test berechnet ($p \leq 0,05$). Mittelwerte, die keinen Buchstaben gemeinsam haben, sind signifikant unterschiedlich. ns, nicht signifikant

Die zuvor beobachtete Reaktion der Hybrid-Pfahlwurzeln scheint erst bei Überschreitung eines bestimmten Schwellenwerts in der *TST2;1*-Expression einzutreten. So ist trotz leicht erhöhter

Expression des vakuolären Saccharose-Belader-Gens *TST2;1* keine Monosaccharid-Akkumulation im Wurzelgewebe zu erkennen (Abbildung 3.31A und B).

Interessant ist auch die Beobachtung der Entwicklung der Zuckerkonzentration im Verlauf der Kinetik bei Pflanzen mit einem erhöhten Transkriptgehalt des endogenen *TST2;1*-Gens im Blattgewebe. Während in der Wurzel kaum ein Unterschied zwischen der Hybride und der 0-Segregante besteht, zeigt das Blattgewebe der Hybride nach Frosteinwirkung deutlich mehr Saccharose und eine etwas geringere Konzentration an Monosacchariden im Vergleich zur 0-Segregante (Abbildung 3.31C).

4 Diskussion

Die Zuckerrübe (*Beta vulgaris*) ist als wichtigste Zuckerquelle in gemäßigten Klimazonen von erheblicher agrarökonomischer Bedeutung. Ihre Frostempfindlichkeit begrenzt jedoch den Anbauzeitraum, was die Effizienz der Zuckerproduktion beeinflusst. Kälte stellt somit eine zentrale Herausforderung für die Pflanze und deren Anbau dar, da sie nicht nur die physiologische Stabilität, sondern auch die Verteilung und Speicherung von Zucker beeinflusst. Ziel dieser Arbeit war es, die Auswirkungen niedriger Temperaturen auf diese Prozesse zu untersuchen, zentrale regulatorische Faktoren zu identifizieren und potenzielle Ansätze für eine Verbesserung der Kältetoleranz zu erarbeiten.

4.1 Vernalisation beeinflusst die *Sink*- und *Source*-Identität und bewirkt eine Umkehr des Phloemtransportstroms von Pfahlwurzeln in Richtung des Sprosses

In dieser Arbeit wurde ein bisher unbekannter Wechsel der *Sink*- und *Source*-Identitäten der Pfahlwurzeln und Sprossen von Zuckerrübenpflanzen bei Kälteexposition entdeckt. Primär kohlenhydratproduzierende Organe werden als *Source*- und primär konsumierende Organe als *Sink*-Organe bezeichnet. Typischerweise nehmen viele *Sink*-Organe wie Samen oder Knollen nach vollständiger Differenzierung und anschließender Trennung von dem entsprechenden *Source*-Organ selbst eine *Source*-Identität annehmen. Im Gegensatz dazu erfolgt bei der Zuckerrübe dieser Identitätswechsel in Reaktion auf Kälte, während Spross- und Pfahlwurzelgewebe verbunden bleiben. Die diskutierten Ergebnisse sind schematisch in Abbildung 4.1 dargestellt

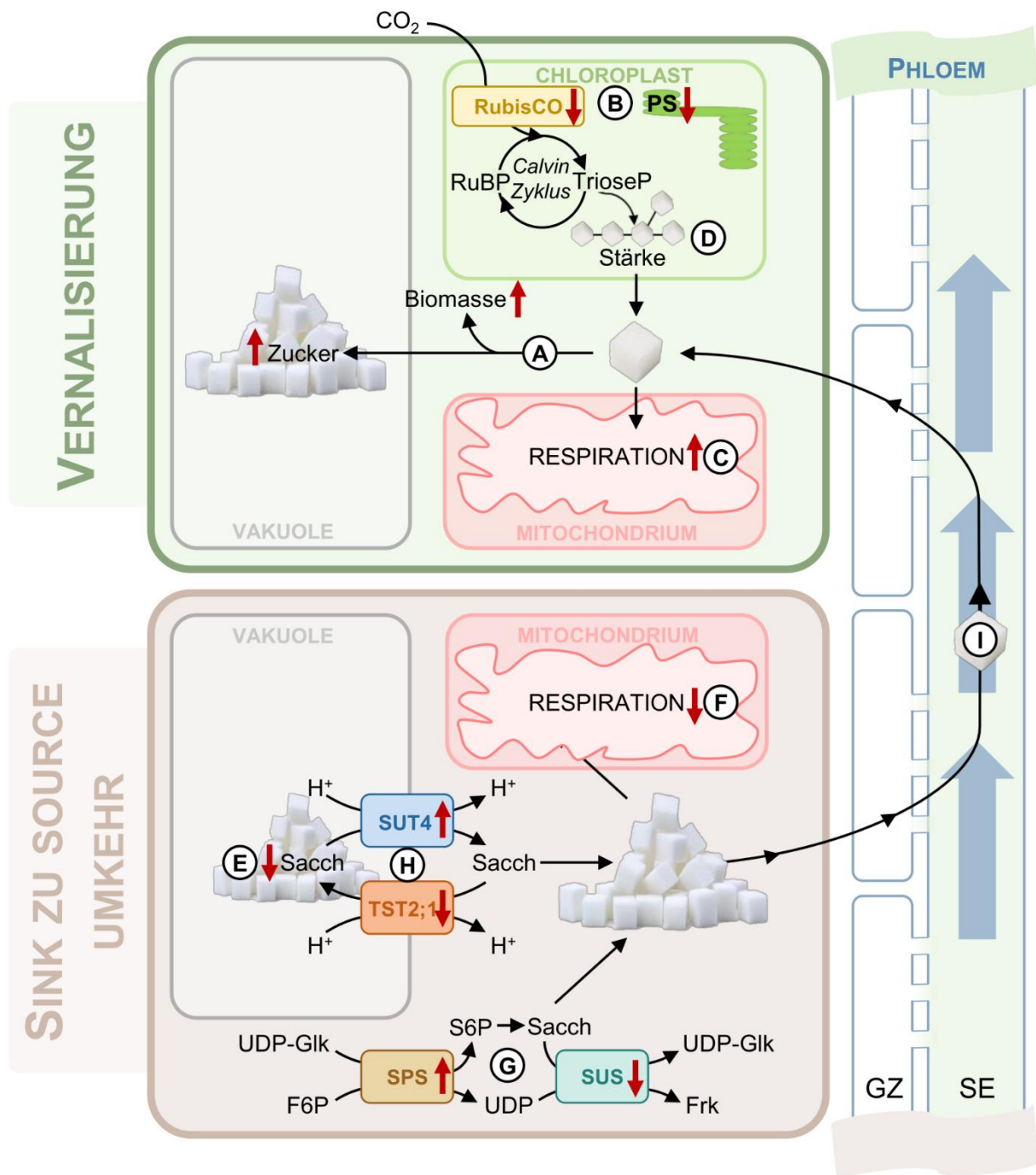


Abbildung 4.1 Schematische Darstellung des kälteinduzierten Übergangs von Sink zu Source.

Während einer Kältebehandlung werden Blatt- und Pfahlwurzelgewebe der Zuckerrübe umprogrammiert, wodurch sich ihre *Source*- und *Sink*-Identitäten umkehren. Die Blätter übernehmen dabei eine *Sink*-Funktion: Trotz verringerter Photosyntheseaktivität und eingeschränkter Kohlenstoffassimilation (B) steigen Biomasse und Zuckerkonzentration im Spross (A). Parallel dazu nehmen die Veratmung im Spross zu (C) und die zellulären Strkepools ab (D). Pfahlwurzeln hingegen zeigen einen Rückgang des Saccharose-Gehalts (E), eine verminderte Atmungsrate (F) sowie eine gesteigerte Saccharose-Biosynthese (G). Die Remobilisierung von Zucker aus der Pfahlwurzel wird in der Kälte durch eine gegenläufige Regulation des pfahlwurzelspezifischen vakuolären Saccharose-Importers (TST2;1) und -Exporters (SUT4) gesteuert (H). Insgesamt resultiert dies in einer Umkehrung des Phloem-Translokationsstroms (I), die mit der Initiierung der Infloreszenz in Zusammenhang stehen könnte. GZ, Geleitzelle; PS, Photosynthese; RuBP, Ribulose-1,5-bisphosphat; SE, Siebelement

4.1.2 Erhaltung von Zuckerreserven trotz reduzierter Photosyntheseleistung in kälteexponierten Zuckerrüben

Bei 4 °C nahm die CO₂-Assimilation im Spross drastisch ab, während die PSII-Aktivität relativ hoch blieb (Abbildung 3.2). Diese gegenläufigen Reaktionen deuten darauf hin, dass der Calvin-Benson-Zyklus unter Kältebedingungen verlangsamt wird, sodass Elektronen aus der photosynthetischen Elektronentransportkette (PET) nicht effizient verwertet werden. Dies birgt das Risiko der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) wie Superoxid, Wasserstoffperoxid oder Hydroxylradikale (Choudhury *et al.*, 2017; Pommerrenig *et al.*, 2018; Suzuki und Mittler, 2006).

Im Verlauf der Kälteexposition (Abbildung 3.1 und Abbildung 3.2) konnte beginnend mit der Akklimatisierungsphase bei 12 °C eine verringerte CO₂-Assimilation verzeichnet werden. Der erhöhte Y(NPQ)-Anteil (Abbildung 3.2A) indiziert, dass bei diesen Temperaturen entweder der Mehler-Ascorbat-Weg (Asada, 1999) oder der Xanthophyll-Zyklus (Farber *et al.*, 1997) als Quenching Mechanismus für die durch PET freigesetzten Elektronen dient. Bei 4 °C scheinen sich diese stressreduzierenden Stoffwechselwege zu verlangsamen, was durch die weitere Abnahme von sowohl Y(II) als auch Y(NPQ), sowie den gleichzeitigen Anstieg von Y(NO) belegt wird. Diese Änderungen weisen auf eine nicht regulierte Energiedissipation hin, die Chloroplastenmembranen und Pflanzenzellen deutlich schädigen kann. Als Reaktion auf diese anhaltend unvorteilhaften Bedingungen bei Kälteeinwirkung wird die Genexpression angepasst, was zu einer effektiven Herunterregulierung der Photosynthese-assoziierten Genexpression führt (Abbildung 3.2C und D). Diese Daten stimmen mit Ergebnissen an *Arabidopsis* überein, in welchen eine Umstellung der Anzucht auf 5 °C in einer reduzierten Photosynthese und erhöhten Expression relevanter Gene wie *AtRBCS*- und *AtCAB* resultiert, wobei sich ersteres nach längerer Kälteexposition erholt (Strand *et al.*, 1997).

Zusammenfassend lässt sich konstatieren, dass diese metabolischen und transkriptionellen Veränderungen letztlich zu einer drastischen Abnahme der CO₂-Inkorporation in Zuckern führen, die für das Wachstum und den Schutz der Zellvitalität in der Kälte erforderlich sind. Trotz einer Inaktivierung der Photosynthese akkumulierten die Zucker weiterhin in den Blättern und nahmen in den Pfahlwurzeln in der Kälte ab (Abbildung 3.1D bis F). Die niedrigeren Saccharose-Konzentrationen und die beeinträchtigte Atmung in den Pfahlwurzeln zeigten, dass Saccharose während der Kälte nicht im gleichen Maße für den Energiestoffwechsel genutzt wurde wie unter Kontrollbedingungen (Abbildung 3.3B). Kältetolerante Pflanzen wie *Arabidopsis* akkumulieren auch nach Eintritt einer Kälteperiode weiterhin Zucker, indem sie die photosynthetische Aktivität aufrechterhalten, die Saccharose-Phloembeladung reduzieren und den Zuckerimport in die Blattvakuolen erhöhen (Nägele und Heyer, 2013; Wingenter *et al.*, 2010). Obwohl *Arabidopsis* die Zuckerrepression der Photosynthese nach längerer

Kälteexposition überwinden kann (Huner *et al.*, 1993; Strand *et al.*, 1997), kommt ein solcher Mechanismus in Zuckerrüben nicht vor. Stattdessen werden durch den drastischen Rückgang der Kohlenstoffassimilation und der Photosynthese die Blätter zu *Sink*-Organen, die folglich mit Zucker aus den Pfahlwurzeln versorgt (Abbildung 3.4).

4.1.3 Kälteinduzierte Remobilisierung von Zucker aus Pfahlwurzelspeichern und die Rolle von Saccharose-Transportern

Bei milden Temperaturen könnte die Reversibilität der *Sink*-Identität von Pfahlwurzeln und die Remobilisierung von Zuckern aus den Speichervakuolen von entscheidender Bedeutung sein, entweder wenn Blätter eine Verwundung durch Insektenfraß überwinden müssen oder nachdem sich im Anschluss an den Winter ein neues stark-konsumierendes Organ, wie z.B. der Blütenstand, bildet. Allerdings reicht eine kurze Kälteexposition aus, um die Remobilisierung von Kohlenhydraten aus den Pfahlwurzelspeichern auszulösen, wie die Bewegung von radioaktiv markierter Saccharose und fluoreszierendem Esculin in Richtung des Sprosses zeigt (Abbildung 3.4). Während die Saccharose-Biosynthese und -Hydrolyse unter warmen und kalten Bedingungen wechselseitig reguliert wurden (Abbildung 3.3D und E), sank der Saccharose-Gehalt in der Pfahlwurzel bei Kältebehandlung (Abbildung 3.1F). In Übereinstimmung mit diesem Prozess konnte ein entgegengesetzte Regulationsmuster für den wichtigsten vakuolären Saccharose-Importer (BvTST2;1) und den mutmaßlichen wichtigsten Exporter (BvSUT4) im selben Gewebe beobachtet werden (Abbildung 3.5). Die *BvTST2;1*-Expression und die BvTST2;1-Abundanz wurden als Reaktion auf die Kälteexposition herunterreguliert, während die *BvSUT4*-Expression einem entgegengesetzten Trend folgte. Die Rolle von BvSUT4 als vakuolären Saccharose-Exporter wird durch seine Homologie zu Saccharose-Transportern der SUT-Familie und durch seine Homologie zu AtSUT4 (Ergänzende Abbildung 9) gestützt, für die sowohl die Saccharose-Exportaktivität als auch die vakuoläre Lokalisierung nachgewiesen wurden (Schneider *et al.*, 2012; Schulz *et al.*, 2011). Es ist unwahrscheinlich, dass Zucker in der Kälte als Monosaccharide über andere Transporter, wie z. B. den INTEGRAL MEMBRANE PROTEIN 1 (IMP1) Transporter, aus den Vakuolen freigesetzt werden (Klemens *et al.*, 2014). Dies liegt daran, dass die vakuoläre Invertaseaktivität - eine Voraussetzung für die vakuoläre Monosaccharid-Bildung und damit den Export - in diesem Entwicklungsstadium extrem niedrig ist (Giaquinta, 1979a, 1979b; Godt und Roitsch, 2006).

4.1.4 Kälteinduzierte Prozesse als Vorbereitung auf das Blühen in Zuckerrüben: Die Verbindung zwischen Zuckerstoffwechsel und Blütenregulatorgenen

Es ist überraschend, dass die Phloemfluss-Umkehr vor dem Schossen stattfand, das heißt vor der Bildung eines Blütenstandes, der dann als neues starkes *Sink*-Organ fungieren und somit den aus der Pfahlwurzel remobilisierten Zucker als Baustein verwenden würde. In der frühen Phase der natürlichen Vernalisation signalisieren wärmere Temperaturen und eine relativ längere Tageslänge noch nicht den Beginn des Frühlings (Mutasa-Göttgens *et al.*, 2010; Ritz *et al.*, 2010). Allerdings ging die Kälteexposition gleichzeitig mit der Umstellung der *Sink-Source*-Identitäten mit einer Anpassung der Expressionsniveaus der Blütenregulatorgene einher. Dies deutet darauf hin, dass der Vernalisationsimpuls zu diesem Zeitpunkt bereits übertragen wurde und die Expression von Blütenregulatorgenen modulierte – ein Prozess, der sowohl im Spross als auch in der Pfahlwurzel transkriptionelle Veränderungen auslöste.

Die Expression der blütenbezogenen Gene *BvBTC1* und *BvBBX19* in Pfahlwurzeln deutet darauf hin, dass unterirdisches Pflanzengewebe das Vernalisationssignal ebenfalls wahrnehmen kann. Es ist nicht auszuschließen, dass der Verlust der Kohlenstoff-Assimilation im Spross und der damit einhergehende Bedarf an Zuckern, die für die Kälteakklimatisierung erforderlich sind, ein *Sink* schaffen, das dann ein Signal zur Aktivierung des Saccharose-Efflux aus der Pfahlwurzel unabhängig vom Schossen auslöst. Dennoch ist naheliegend, dass die Zuckerrübe möglicherweise einen oder mehrere Faktoren nutzt, die sowohl das Schossen als auch den Übergang zwischen *Sink* zu *Source* integrieren, ähnlich wie das kürzlich beschriebene phloem-mobile FT-Homolog StSPS6A (Tuberigen) in der Kartoffel (*Solanum tuberosum*; Abelenda *et al.*, 2019; Navarro *et al.*, 2011). Dieser Faktor oder diese Faktoren können bereits identifiziert worden (Broccanello *et al.*, 2015; Pfeiffer *et al.*, 2014; Tränkner *et al.*, 2017) oder noch unentdeckt sein.

4.2 Die Rolle von SUT4 in der Kälteanpassung von Zuckerrüben

Im vorherigen Kapitel wurde die bemerkenswerte Fähigkeit von Pflanzen zur Anpassung an Kälteperioden und die damit einhergehenden Veränderungen in der Kohlenhydratregulation untersucht, insbesondere im Hinblick auf die Umlagerung von Zuckerressourcen. Nun wird näher auf einen spezifischen Akteur in diesem Prozess eingegangen - dem **SUCROSE TRANSPORTER 4** (SUT4), einem Schlüsselakteur in der Verteilung von Zucker in Pflanzen. Der vakuoläre Zucker-Entlader SUT4 scheint bei der Kälteantwort von Pflanzen, insbesondere bei Zuckerrüben, eine entscheidende Rolle zu spielen. Dementsprechend konnte im Rahmen dieser Arbeit eine kältebedingte Expressionserhöhung des entsprechenden Gens im

Wurzelgewebe beobachtet werden (Abbildung 3.8), welches vermutlich zu einer gesteigerten Abundanz des Proteins und folglich ebenfalls gesteigerten Freisetzung vakuolär gespeicherter Saccharose führt. Entsprechend der primären Funktion der Pfahlwurzel als Ressourcen-Speicher, erscheint der beschriebene kältegesteuerte Mechanismus durchaus sinnvoll, da somit der zuvor eingelagerte Zucker dem in Kälteperioden massiv gestressten und selbst nicht mehr zur ausreichenden Zuckersynthese fähigen Blattgewebe überbrückend zur Verfügung gestellt wird. Zwar würde die Funktion dieses Stoffwechselwegs die Pflanze vermutlich über die Winterphase bringen, aber auch den kommerziell nutzbaren Anteil an Zucker drastisch reduzieren. Demnach wird zukünftig die Herstellung von *sut4*-Mutantenpflanzen in Zuckerrüben relevant sein, um die Auswirkungen des Verlustes des vakuolären Saccharose-Effluxes auf die Blüteninduktion und Kältetoleranz zu untersuchen. Aufgrund der Tatsache, dass die Herstellung mutagener Zuckerrüben sehr aufwändig ist, wurde zwischenzeitlich die physiologische Rolle des Transporters in *BvSUT4*-exprimierenden *Arabidopsis*-Pflanzen untersucht.

4.2.1 Mechanismen der subzellulären Zuckerverlagerung und die Auswirkungen auf die Membranintegrität bei Kälte

Eine typische Reaktion höherer Pflanzen auf Kälte ist die Akkumulation vakuolärer Zucker, insbesondere von Monosacchariden (Pommerrenig *et al.*, 2018; Tarkowski und van den Ende, 2015; Wingenter *et al.*, 2010). Eine Studie von Vu *et al.* (2020) deutet jedoch darauf hin, dass diese primär durch eine beschleunigte Akkumulation vakuolärer Saccharose in Kombination mit der Aktivität sog. saurer Invertasen begründet ist. Folglich resultiert eine verstärkte Verschiebung des Zuckers aus der Vakuole voraussichtlich in einem niedrigeren Anteil an gespaltenen Saccharose. Dieser Effekt wird durch die in Abbildung 3.9 dargestellten Messungen gestützt. Dementsprechend korreliert eine *BvSUT4*-Expression und damit einhergehend einem potenziell erhöhten Saccharose-Ausschluss aus der Vakuole negativ mit dem Mono-/Disaccharid-Verhältnis. Besonders deutlich ist diese Fähigkeit zur Anhäufung des Disaccharids mit einem lokalen Maximum bei 45h in der zusätzlich *AtTST2/1*-defizienten Linie ausgeprägt, da hierbei zusätzlich zum verstärkten Export, aufgrund der Abwesenheit essentieller Transporter, ebenfalls weniger Zucker in die Vakuole transportiert wird. Im Gegensatz dazu akkumuliert die *AtSUT4*-defiziente Linie unmittelbar nach Kälteeintritt vorwiegend Monosaccharide und vergleichsweise wenige Saccharose, was erneut die kälteinduzierte Verstärkung saurer und weniger von zytosolischer Invertase-Aktivität unterstreicht. Die Abwesenheit zytosolischer Zucker wird von zellulären Sensorik-Mechanismen (*sugar signalling*) als Mangelsignal wahrgenommen und führt in der zuletzt genannten Mutante zu einer ausgeprägteren Stärkeabnahme bei Nacht (Streb und Zeeman, 2012). Ein bekannter Signalintegrator, welcher eines der Spaltprodukte der Saccharose, die

Glukose wahrnehmen kann, ist in der Lage entsprechend dem Status verschiedene Gene direkt zu regulieren und dadurch bei hoher Zuckerverfügbarkeit beispielsweise die Photosyntheseleistung zu unterdrücken. Gemeint ist die Hexokinase 1, deren sekundäre Funktion als Zucker-Sensor eine weitaus wichtigere Rolle einnimmt als die enzymatische (Moore *et al.*, 2003). Im Gegensatz zur Expression im Wildtypen, welche bei Kältebedingungen leicht reduziert wird, steigt diese in allen drei BvSUT4-exprimierenden Pflanzen, was erneut die hohe zytosolische Zuckerkonzentration unterstreicht (Abbildung 3.11).

Zusätzlich zur Bestätigung der bereits getroffenen Annahme, dass die Akkumulation von Monosacchariden in der Vakuole vorwiegend durch die Spaltung eingespeister Saccharose begründet ist, konnte durch die Bestimmung der elektrischen Leitfähigkeit der in Kapitel 3.2.1.4 untersuchten Linien die Akklimatisierungs-relevante Rolle vakuolär lokalisierter Zucker demonstriert werden. Dementsprechend weisen die Akkumulations-defizienten Linien verglichen mit dem Wildtyp als auch der *AtSUT4*-Mutanten nach Frostapplikation einen erhöhten Elektrolytverlust auf, was ein Indikator für eine verschlechterte Membranintegrität darstellt.

4.2.2 Rolle von BvSUT4 im Langstreckentransport und in der Blütenentwicklung

Die Untersuchung der subzellulären Prozesse zeigt deutlich, dass neben der Funktion vakuolärer Zucker-Importer auch der Haupt-Exporter SUT4 eine essentielle Rolle bei der Anpassung der Zuckerverteilung als Reaktion auf unvorteilhafte Umwelteinflüsse einnimmt. Demnach scheint der Transporter tatsächlich eine ausschlaggebende Stellschraube zur Generierung kältetoleranter Zuckerrüben zu sein. Basierend auf dem potenziell vorteilhaften Effekt einer BvSUT4-Mutation wurde weiterhin der umgekehrte Ansatz einer heterologen Expression des Gens in *Arabidopsis* gefahren, um diese auf ihr Verhalten bezüglich des Langstreckentransports zu analysieren.

In der Tat zeigen die Ergebnisse in Abbildung 3.12, dass eine *BvSUT4*-Expression in *Arabidopsis* zu einer Allokation der Zucker in Richtung der derzeitigen *Sinks* und folglich einer Induktion der Blüte führt. Entsprechend der 2021 in Keller, Martins Rodrigues, *et al.* zusammengetragenen Zucker-abhängigen Stoffwechselwege, ist der Langstreckentransport maßgeblich durch die subzelluläre Zucker-Verteilung in Mesophyll-Zellen beeinflusst (Lemoine *et al.*, 2013). So fördert eine hohe Saccharose-Konzentration im Zytosol des Mesophylls die Ausbildung von Zellwandinwüchsen in der letzten Schicht des symplastischen Mesophyllkontinuums, den Phloem-Parenchym-Transfer-Zellen (McCubbin und Braun, 2020; Wei *et al.*, 2020). Die zugrundeliegenden Mechanismen sind noch unbekannt, aber *GIGANTEA*, ein an der Blütenentwicklung beteiligtes Gen, scheint an der Regulierung dieser strukturellen Änderungen der Zellen beteiligt zu sein (Fowler *et al.*, 1999). Durch die

beschriebene anatomische Anpassung wird die Fläche zur Integration der für den apoplastischen Weg essentiellen Proteine SWEET11 und 12 vergrößert (Chen *et al.*, 2012). Dadurch kann mehr Transport-Zucker in den Apoplasten gelangen, was wiederum zu einer Erhöhung der Aktivität des Phloem-Beladers SUC2/SUT1 führt. Diese ist neben einer erhöhten Expression des Transporter-Gens selbst (Abbildung 3.11B), ebenfalls durch weitere Faktoren, wie einer stärkeren Ansäuerung des Apoplasten durch H⁺-ATPasen aufgrund einer Saccharose-induzierten 14-3-3-Protein-Bindung oder einer Calcium-induzierten Phosphorylierung durch WAKL8 (**W**ALL-**A**SSOCIATED RECEPTOR **K**INASE-**L**IKE 8) reguliert (Wei *et al.*, 2020; Xu *et al.*, 2020). Tatsächlich ist am Morgen vor dem Transfer auf 4 °C ein Calcium-Peak zu erkennen (Abbildung 3.13C). Dieser könnte verschiedene Ursachen haben, jedoch dürfte es in Verbindung mit der hohen Saccharose-Konzentration der Expressions-Mutanten wahrscheinlich sein, dass die Akkumulation apoplastischer Saccharose zu einer Calcium-Freisetzung führt, die aufgrund der Eigenschaft als Signalmolekül die zuvor erwähnte Aktivierung von WAKL8 bewirkt.

Um bei den Kation-Messungen zu bleiben, fällt primär der niedrige Natrium-Gehalt der Mutanten verglichen mit dem Wildtypen auf (Abbildung 3.13A). Dies mag durch die Saccharose-Induktion des in der Vaskulatur befindlichen Kalium-Kanals AKT2/3 begründet sein, welcher wiederum die Zuckerbeladung des Siebelement/Geleitzellen-Komplexes reguliert (Dreyer *et al.*, 2017). Das Fehlen des Transporters führt zu einem weniger effizienten Langstreckentransport, da dieser im Normalfall den Verlust des diffundierten Zuckers zur Membranenergetisierung ausgleicht. So bilden $\Delta akt2/3$ -Mutanten deutlich weniger Infloreszenzen verglichen zu Wildtyp-Pflanzen (Deeken *et al.*, 2002). Es ist bekannt, dass AKTs wenig selektiv und deshalb ebenfalls Natrium-durchlässig sind (Rodríguez-Navarro, 2000). Zudem erfüllt Kalium bei der Etablierung der Kälteakklimatisierung zahlreiche Aufgaben. Neben der Reduktion der ROS-Produktion aufgrund eines induzierten erhöhten Antioxidantien-Spiegels, agiert Kalium als Osmolyt und führt demnach zu einer Erniedrigung des Gefrierpunkts (Chérel und Gaillard, 2019; Shabala und Pottosin, 2014; Rodríguez-Navarro und Rubio, 2006; Leigh und Wyn Jones, 1984). Besonders relevant ist Kalium als Coenzym für bei der Frostresistenz-Entwicklung involvierte Enzyme (Marschner, 2011; Taiz *et al.*, 2023). Vor allem die letzte Funktion ist kaliumspezifisch, weshalb stattdessen womöglich Natrium ersatzweise als Faktor zur Aufrechterhaltung des Phloem-Stroms entlang des kompletten Transportweges fungiert und somit wegbereitend Richtung Wurzel transportiert und somit im bemessenen Blattgewebe reduziert wird. Entsprechend der Hochregulierung der Phloembeladung wird ebenfalls die Xylembeladung im Wurzelgewebe mit Ionen aktiviert, um den hydrostatischen Druck aufrechtzuerhalten, was durch die erhöhte Nitrat abundanz in den BvSUT4-Mutanten visualisiert wird (Abbildung 3.13H). Schließlich gibt es zahlreiche Belege für den Einfluss des Stickstoff-Stoffwechsel auf den Kohlenhydrat-Haushalt und *vice versa*

(Coruzzi und Zhou, 2001; Nunes-Nesi *et al.*, 2010). So fördert eine erhöhte Verfügbarkeit von Kohlenstoff (in diesem Fall Saccharose im Zytosol) die Stickstoff-Aufnahme, was im Fall der Mutanten durch die im Zytosol verfügbare Saccharose und des vergleichsweise hohen Natrium-Gehalts visualisiert wird. Da Zucker als Baustoff für viele weitere Prozesse fungiert, werden auch diese unterstützt. Ein Beispiel ist der Citratzyklus, wobei zumindest zu Beginn der Messungen etwas mehr Citrat in den BvSUT4-Linien zu messen ist. Fortlaufend ist diese Erhöhung auch in den anderen Substraten des Zykluses zu erkennen (Abbildung 3.14).

4.3 BvIMP2 als ein zentraler Regulator der Zuckerhomöostase in Zuckerrüben

Um eine dynamische Zuckerhomöostase zu ermöglichen, sind neben vakuolären Zucker-Exportern ebenfalls Belader erforderlich. Zusätzlich zu Ausgleichstransportern wie dem Arabidopsis-SWEET17 (**SUGARS WILL EVENTUALLY BE EXPORTED TRANSPORTER**) existieren sekundär aktive Transporter wie der AtTST1 (**TONOPLAST SUGAR TRANSPORTER**) und 2 sowie den Saccharose-transportierendem Pendant in Zuckerrübe BvTST2;1 (Jung *et al.*, 2015; Wormit *et al.*, 2006). Darüber hinaus wurde ein weiterer vakuolärer Zuckertransporter in Arabidopsis identifiziert (Abelenda *et al.*, 2019; Khan *et al.*, 2023). Aufgrund der genetischen Nähe zu dem bekannten Transporter ERDL6 (**EARLY RESPONSE TO DEHYDRATION LIKE**), lautet der aktuelle Arbeitstitel AtERDL4 (Ergänzende Abbildung 12; Khan *et al.*, 2023; Poschet *et al.*, 2011). Parallel dazu wurde das Homolog in Zuckerrübe, BvIMP2 (**INTEGRAL MEMBRANE PROTEIN**), identifiziert und im Rahmen dieser Arbeit anfänglich charakterisiert. Die Benennung erfolgte ebenfalls aufgrund der Ähnlichkeit zu dem 2013 von Klemens *et al.* beschriebenen ERDL6-Zuckerrüben-Homolog BvIMP1 (Ergänzende Abbildung 12).

4.3.1 Subzelluläre Effekte einer BvIMP2-Expression auf die subzelluläre Zucker-Allokation als Teil der Kälteantwort

Zu Beginn wurden grundlegende Faktoren zur Charakterisierung des Transporters untersucht. Demnach handelt es sich bei BvIMP2 um einen tonoplastidär lokalisierten Transporter, welcher offenbar sowohl Di- als auch Monosaccharide als Substrat verwendet (Abbildung 3.15). Dementsprechend akkumulieren die BvIMP2-exprimierenden Pflanzen besonders nach andauernder Kälteeinwirkung, mehr Zucker als der korrespondierende Wildtyp (Abbildung 3.17). Die Fähigkeit der Mutanten zur verstärkten Zucker-Speicherung wird durch die erhöhte Expression des zellulären Zuckersensors AtCAB1 gestützt (Abbildung 3.19). Das berechnete Mono- zu Disaccharid-Verhältnis deutet auf eine höhere Spezifität gegenüber Monosacchariden. Zwar wurde bereits in Kapitel 4.2.1 basierend auf den Erkenntnissen von Vu *et al.*, 2020 festgestellt, dass eine Präferenz gegenüber der vakuolären Speicherung von Monosacchariden vorwiegend durch die kälteinduzierte Aktivität saurer Invertasen, und nur

sekundär durch die Affinität einzelner Transporter begründet ist. Jedoch zeigen die Aufnahme-Studien an *Xaenopus laevis* Oozyten zu allen gemessenen Zeitpunkten tatsächlich eine höhere Transportrate von Fruktose verglichen mit den anderen bemessenen Zuckern (Abbildung 3.15). Übereinstimmend handelt es sich hierbei um ein nicht nur kälte- sondern auch zuckerreguliertes Protein. Während Kälte zu einer Hochregulation des BvIMP2-Transkripts führt, bewirkt die Zugabe von Glukose, Fruktose oder Saccharose eine Reduktion der Transkriptabundanz. Dieses Regulationsmuster unterscheidet sich deutlich von dem der verwandten Transporter AtTMT1 und AtTMT2, deren Expression durch Zucker kaum beeinflusst wird (Abbildung 3.16; Wingenter *et al.*, 2010). Dies liegt womöglich an der globalen Lokalisierung und der damit einhergehenden Rolle des Transporters.

4.3.2 BvIMP2 als subzellulärer Feinregulator zur Steuerung der Langstreckentransport-Intensität

Das Homolog AtERDL4 ist Aufnahmen mittels des GUS-Reporter-Systems zufolge, vor allem bei Kälte, vorwiegend im vaskulären Gewebe aufzufinden (Ergänzende Abbildung 13; Khan *et al.*, 2023). Demnach liegt die Vermutung nahe, dass diese Art von Transporter bei der Regulierung des Phloem-Stroms eine Rolle spielt. In der Übersicht der Prozesse zur Verteilung der Kohlenstoffressourcen in Pflanzen von Keller, Martins Rodrigues, *et al.* aus 2021 wurde unter anderem gezeigt, dass eine erhöhte zytosolische Saccharose-Konzentration die Basis für einen adäquaten Export des Zuckers in den Apoplasten und folglich auch für den Einstieg in den Langstreckentransport bildet. So könnte der Transporter Teil einer subzellulären Feinregulierung für den soeben beschriebenen Mechanismus sein. Folglich ergibt die gegensätzliche Zucker-Regulierung des vaskulär lokalisierten Transporters verglichen zum bekannten AtTST1 in diesem Gewebe durchaus einen Sinn.

Ein Anstau der Zucker in Phloem-Parenchym-Transfer-Zellen wird durch die Herunterregulierung des entsprechenden Gens noch verstärkt und führt zu einer effizienten Phloembeladung. Daraus ergibt sich die Frage zur eigentlichen physiologischen Rolle des Transporters. Angenommen die Zuckerregulierung findet graduell statt und hätte ebenso wie die beobachtete Herunterregulierung bei erhöhter Abundanz eine Steigerung des Transkriptgehalts bei niedriger Gehalte der zytosolischen Zucker zur Folge, würde bei einer Mangelsituation der Großteil des synthetisierten Zuckers in die Vakuole sequestriert, sodass die Mechanismen zur Initiierung des Langstreckendtransports nicht angeschoben werden. Demzufolge scheint der Transporter maßgeblich bei der Entscheidung zwischen der Versorgung des umliegenden Organs vs. der Versorgung der Gesamtpflanze beteiligt zu sein. Außerdem zeigten die unveröffentlichten Daten zur Lokalisierung des AtERDL4 bei Kälte eine Verlagerung des der GUS-Färbung in den Perizykel, also womöglich in die Geleitzellen (Ergänzende Abbildung 13). Die bisher beschriebene Regulierung des Transporters könnte

bei einer geleitzellenspezifischen Lokalisierung den Phloem-Sog aufrechterhalten und somit, zumindest in den Übergangsbereichen zwischen Phloem-Parenchym die Kalium-Pumpe ergänzen (Dreyer *et al.*, 2017). Womöglich ist die Ergänzung, abhängig vom Bedarf, auch lediglich zeitlich begrenzt. Dies würde zumindest die niedrigeren Kalium-Gehalte der transgenen Pflanzen unter Normalbedingungen erklären (Abbildung 3.23). Die widersprüchlichen Beobachtungen eines vergleichsweise hohen Zuckergehalts im Phloem-Exudat BvIMP2-exprimierender Arabidopsis-Pflanzen, trotz niedriger *SUC2*-Expression, ist vermutlich durch den pleiotropen Effekt einer Expression unter ubiquitärem Promoter des Transporters begründet, die keine Umwelt-abhängige Zell-Spezifität der Aktivität zulässt (Abbildung 3.20). Folglich führt die Omnipräsenz des heterologen Transporters zu einer Ambivalenz zwischen dem Sog in Richtung Phloem und in Richtung des Mesophyllgewebes. Dennoch führt eine *BvIMP2*-Expression in Arabidopsis zu einer induzierten Blütenbildung, was für eine leichte Tendenz in Richtung des Phloems spricht (Abbildung 3.22).

4.3.3 Die globale Rolle von BvIMP2 in Zuckerrüben: Einfluss auf Zucker-sensitive Prozesse und den Langstreckentransport

Die in Arabidopsis beobachteten Prozesse gilt es auch in Zuckerrübe zu bestätigen. Leider ist das üblicherweise verwendete β -Glucuronidase-Reportergen für Messungen in Zuckerrüben nicht geeignet, da das Enzym durch phenolische Verbindungen in den Pfahlwurzeln gehemmt wird (Vainstein *et al.*, 1993) und eine intrinsische Enzymaktivität in nicht-transgenen Zuckerrüben beobachtet werden kann (Wozniak und Owens, 1994). Auch die Lokalisierung des Phloem-Beladers BvSUT1 konnte lediglich im Blattgewebe mittels zuvor genannter Technik identifiziert werden (Nieberl *et al.*, 2017). Zur Bestätigung der Annahme einer vaskulären Lokalisierung des endogenen Zuckerrüben-Transporters wurde daher die gewebespezifische *BvIMP2*-Expression zu verschiedenen Zeitpunkten nach Transfer auf 4 °C untersucht. Tatsächlich verlagert sich die anfänglich erhöhte Expression in der Blattspreite mit andauernder Kälte in die Petiole, wo sie mehr als das Vierfache des anfänglichen Wertes annimmt (Abbildung 3.20A).

Eine weiterführende, unkonventionelle Analyse untersuchte die *Source*-definierende Funktion von BvIMP2. Demzufolge zeigen Blätter, welche verbunden mit der Gesamtpflanze als einziges belichtet wurden verglichen mit Blättern unbehandelter Zuckerrüben-Pflanzen im Laufe eines Tages eine erhöhte *IMP2*-Expression wobei der umgekehrte Fall bei den unbelichteten Blättern eintritt. In abgedunkelten Blättern sind sowohl die BvSUT1-Expression als auch die Gehalte an Glukose, Fruktose und Saccharose deutlich reduziert. In belichteten Blättern hingegen bleiben diese Werte stabil, was auf eine lichtabhängige Regulation und eine potenzielle *Source*-definierende Rolle von BvIMP2 hindeutet (Abbildung 3.21)

Diese Beobachtungen stützen die Annahme, dass BvIMP2 nicht nur subzellulär, sondern auch auf gesamter Gewebe- und Organebene als Regulator der Zuckerallokation fungiert. Die lichtabhängige Expression von BvIMP2 in belichteten Blättern sowie die gleichzeitige Stabilität der Zucker- und BvSUT1-Gehalte unterstreichen seine Rolle als positiver Marker für *Source*-Gewebe. Im Gegensatz dazu geht in Dunkelheit eine verminderte *BvIMP2*-Expression mit einem Rückgang der Zucker- und *BvSUT1*-Level einher, was auf einen Übergang in den *Sink*-Zustand hindeutet. Bemerkenswert ist, dass BvIMP2 dabei offenbar nicht der Speicherung, sondern der gezielten Weiterleitung von Ressourcen an bedürftige Pflanzenteile dient.

Vor diesem Hintergrund kommt BvIMP2 eine zentrale Funktion in der systemischen Kohlenstoffverteilung unter Kälteeinfluss zu – möglicherweise als Steuerfaktor bei der Priorisierung zwischen lokaler Versorgung und dem übergeordneten Bedarf der Gesamtpflanze.

4.4 Einfluss einer *AtTST1*-Expression auf die Kälteanpassung und Zuckerakkumulation von Zuckerrüben bei entkoppelter Betrachtung der *Source*- und *Sink*-Funktionen

Nachdem gezeigt werden konnte, dass aus Zuckerrübe stammende vakuoläre Transporter nicht nur die subzelluläre sondern auch die globale Zuckerhomöostase transgener Pflanzen regulieren kann, ist dementsprechend die Folge einer Veränderung der vakuolären Zuckerbeladung in Zuckerrüben selbst von Interesse um potenzielle züchterische Ansätze zu entwickeln. Dieses Ziel anstrebbend wurden zwei durch die KWS SAAT SE& Co KGaA bereitgestellte Hybrid-Linien bezogen auf das physiologische Verhalten bei Kälte untersucht. Es handelt sich um Hybride, welche verglichen mit der korrespondierenden 0-Segregante einen erhöhten *AtTST1*-Transkriptgehalt sowohl im Wurzelgewebe vorwiegend jedoch im Blattgewebe vorweisen (Abbildung 3.25). Hierbei handelt es sich um einen tonoplastidär lokalisierten, sekundär aktiven Transporter, welcher sowohl Mono- als auch Disaccharide akzeptiert und dessen Aktivität womöglich durch posttranslationale Modifikationen am zentralen Loop aufgrund abiotische Faktoren induziert wird (Schulze *et al.*, 2012; Wingenter *et al.*, 2010; Wormit *et al.*, 2006).

Das Phänomen einer erhöhten Biomasse-Produktion einhergehend mit einem niedrigerem Wassergehalt konnte bereits bei GT1-3 aus Kapitel 3.1 beobachtet werden (Abbildung 3.26). Erklärt wurde dieses durch einen möglichen kälteinduzierten *Sink* zu *Source* Umwandlung in der Rübe. Die Expression des vakuolären Zuckerladens *AtTST1* könnte entsprechend zu einer Verzögerung dieses Identitäts-Wechsels als Folge einer Zucker-Verarmung des Zytosols der Wurzelzellen führen und dementsprechend den eingangs zu verbuchenden Biomasse-Verlust in den Hybriden begründen. Tatsächlich akkumulieren Wurzeln aller drei Genotypen bei

andauernder Kälteeinwirkung vorwiegend Monosaccharide, wobei der Anstieg in *AtTST*-exprimierenden Pflanzen deutlich steiler ist (Abbildung 3.26). Zusätzlich zur Sequestrierung der Zucker durch die Anwesenheit des *AtTST1*, könnte die wahrscheinlich niedrige Affinität des unter Kälte aktivierten *BvSUT4* gegenüber Monosacchariden aufgrund der hohen Affinität gegenüber Saccharose zum effizienten Zurückhalten des Zuckers im Wurzelgewebe beitragen (Abbildung 3.8; Weise *et al.*, 2000). Schlüssigerweise sind zum selben Zeitpunkt weniger Monosaccharide im Blattgewebe der Hybrid-Linien messbar (Abbildung 3.26)

Um die postulierte unterstützende Wirkung einer Speicherung von Zuckern in der Vakuole des Wurzelgewebes bei der Kälteakklimatisierung zu überprüfen, wurde eine Kinetik des Elektrolytverlusts von Blatt- sowie Wurzelgewebe bei zweistündigem Frost (-6 °C) angefertigt, da dieser ein Maß für die Beschädigung der Membranen darstellt (Abbildung 3.27). Demnach führt eine Speicherung von Zuckern in der Vakuole einen vergleichsweise niedrigen Elektrolytverlust in Rüben- sowie Wurzelgewebe, was für eine aufrechterhaltene Integrität der Zellmembran spricht und auf einen frostprotektiven Effekt der beschleunigten Akklimatisierung durch den vakuolär gespeicherten Zucker schließen lässt (Steponkus, 1984).

Im Blattgewebe stellt sich das Ergebnis weniger eindeutig dar. So zeigt eine der beiden Hybride (*TST0.1*) auch in diesem Gewebe eine erniedrigte Elektrische Leitfähigkeit, wohingegen die andere (*TST0.4*) mit weniger Stabilität als die 0-Segregante zu kämpfen hat. Erstere regeneriert sich augenscheinlich nach Re-Akklimatisierung auf Standard-Bedingungen als einzige (Abbildung 3.27). Interessanterweise handelt es sich bei den im entsprechenden Blatt austretenden Elektrolyten am wenigsten um Monosaccharide, wohingegen das Wurzelgewebe vorwiegend Saccharose halten kann (Abbildung 3.28). Somit kann die oftmals aufgestellte Hypothese einer kalte- bzw. frostprotektiven Wirkung vakuolär gespeicherter Monosaccharide gestützt werden (Boller und Wiemken, 1986; Slewinski, 2011). Jedoch scheint für das Wurzelgewebe eher die Fähigkeit zum Zurückhalten der Saccharose zum Aufbau einer Frosttoleranz von Vorteil zu sein.

Der hiermit angedeutete vorteilhafte Effekt einer *AtTST1*-Expression ist zumindest im autotrophen Gewebe kritisch zu betrachten, da in diesem Gewebe weitere Faktoren einbezogen werden müssen. Bezogen auf die hierbei im Gesamtzusammenhang der Pflanze einzigartige Funktion, sind die Hybride schon nach dem ersten Akklimatisierungsschritt nicht in der Lage ebenso viel CO₂ wie die 0-Segregante zu fixieren und assimilieren (Ergänzende Abbildung 14). Die Ursache hierfür ist sicherlich vielschichtig. Zum einen ist in den selben Pflanzen ein erhöhter Stärkegehalt gemessen worden, deren Synthese energetisierte Zucker als Ausgangssubstanz benötigen, welche einen Großteil der zellulären Energie-Pools in Form von ATP abgreifen könnte, der folglich nicht für den Calvin-Benson-Zyklus zur Verfügung steht (Smith *et al.*, 2005; Zeeman *et al.*, 2010). Zum Anderen sind zu diesem Zeitpunkt die

Zuckerlevel verglichen zur 0-Segregante erhöht was aufgrund einer vorgetäuschten Überflusssituation zu einer minimierten Photosyntheserate führen kann, die durch die geringere PSII-Quantenausbeute auch angedeutet ist und wiederum die Kohlenstoff-Fixierung wegen fehlender Produktion von Reduktions-Äquivalenten inhibiert. Oder der gegenteilige Fall tritt ein, bei dem es sich um eine vermeintliche Mangel-Situation handelt, welche durch das effiziente Weggreifen zytosolischer Zucker angenommen wird. Hierbei würde eine Erhöhung der Photosyntheserate als Basis der Baustoff-Bildung in Form von Zuckern angestrebt, welche durch eine Öffnung der Stomata induziert werden könnte. Angesichts der bereits ausgelasteten Prozesse würde dies lediglich zu einem Verlust des im Apoplasten befindlichen CO₂ führen.

Zusätzlich zur mangelhaften Situation der Photosynthese-bezogenen Faktoren bei Kälte, scheinen die Pflanzen bereits während der Akklimatisierungs-Phase, welche schließlich erst den frostprotektiven Effekt einer AtTST1-Expression hervorbringt, sensibler gegen biotische Faktoren wie Pathogenen zu sein. Demensprechend bietet der im Blatt gespeicherte Zucker bedauerlicherweise ein hervorragendes Milieu für Pilze, wie in diesem Fall dem zuckerrübensspezifischen *Cercospora beticola*. Zwar sind die durch den Ascomycet verursachten Läsionen üblicherweise prominenter als die auf den photographischen Aufnahmen der Blätter der untersuchten Linien, jedoch sind hierbei bereits Anfänge einer Infektion zu erkennen. Der Erwartung entsprechend zeigen vor allem die größeren Zuckerproduzierenden Blätter der AtTST1-Expressoren eine starke Gelbfärbung sowie eine vergleichsweise höhere Anzahl an Läsionen (Ergänzende Abbildung 14).

Die divergente Reaktion der zwei verbundenen Haupt-Bestandteile der Zuckerrübe auf eine gesteigerte Zuckerbeladung der Vakuole lässt keine eindeutige Aussage über den Nutzen dieser bei der Unterbindung der in Kapitel 3.1 aufgedeckten kälteabhängigen *Source-Sink*-Umkehr des Wurzelgewebes. Da in diesem Stadium der Verbleib des bereits akkumulierten Zuckers und eine unbeschadete Überwinterung des Rübengewebes und weniger die Biosynthese neuer Zucker im Vordergrund steht, wurden die beiden Bereiche physiologisch entkoppelt. Neben der Tatsache, dass zu diesem Zeitpunkt die Photosynthese auf ein Minimum reduziert ist und ein Ausbleiben dieser bedingt durch ein abgetrenntes Blattgewebe nicht weiter ins Gewicht fallen würde, birgt der Ansatz darüber hinaus weitere Vorteile. Nicht nur, dass eine Sprossabtrennung ohne Weiteres mit der bestehenden Ernte-Routine bewältigt und demnach in den Agrar-Alltag integriert werden kann, könnte die verbleibende Blattmasse eine zusätzliche Barriere zur Kälte aufbauen. Bedauerlicherweise resultiert die Durchführung der unkonventionellen Herangehensweise zur Freilegung des empfindlichen Herzgewebes, welches folglich anfälliger gegenüber Schadstoffregern zu sein scheint (Keller, Müdsam, *et al.*, 2021). Die Suszeptibilität des freigelegten Gewebes ist Genotyp-unabhängig zu beobachten, jedoch zeigt das Herzgewebe der 0-Segregante bereits ohne Dekapitation

betroffene Stellen im Bereich des Herzgewebes, was wiederum eine gewisse Zuversicht bezüglich einer *AtTST1*-begründeten Toleranzsteigerung des Rüben- gegenüber Frost zulässt (Ergänzende Abbildung 15).

4.5 Einblicke in die Rolle des Pithgewebes bei der Zuckerhomöostase von Zuckerrüben

Ein Verständnis über die grundlegenden Prozesse im entsprechenden Gewebe könnte der Schlüssel für gentechnische Ansätze sein. Deshalb wurde der Zucker-Gehalt des Rüben-, Herz- sowie (insofern vorhanden) des Blattgewebes photometrisch qualifiziert um dessen Lokalisierung einzugrenzen. Bezogen auf das nach Extraktion des Herzgewebes verbleibende Rüben- Gewebe sind keine Veränderungen resultierend aus einer Abtrennungen des Sprosses zu erkennen (Ergänzende Abbildung 16). Lediglich der Fakt, dass die *AtTST*-Expressoren unabhängig von der Anwesenheit des Sprosses zu Beginn über weniger Saccharose dafür mehr Stärke als die 0-Segregante verfügen, ist ersichtlich. Dementsprechend speist die 0-Segregante ihren Bedarf an kalteprotektiven Monosacchariden im Wurzelgewebe aus dem bestehenden Saccharose-Pools der Gesamt-Pflanze, während die *AtTST1*-Hybride vorwiegend den Stärke-Pool angreifen. Interessant ist hierbei, dass der als frostsensitiver eingestufte Genotyp TST0.4 zunächst einen Glukose-Maximum im Blattgewebe aufweist, wohingegen der Genotyp TST0.1 direkt den Wurzel-Speicher füllt. Dass es sich bei letzterem um den offenbar toleranteren Genotyp handelt, könnte dies ein weiteres Anzeichen für die kalteprotektive Wirkung von Monosacchariden spezifisch im Wurzelgewebe sein. Wirklich aufschlussreich wird es bei Betrachtung des Herzgewebes. Während das Herzgewebe intakter Zuckerrüben lediglich ein zeitliches Maximum an Monosacchariden nach der ersten 4 °C-Phase aufweisen, steigen die Werte im entsprechenden Gewebe Spross-befreiter Pflanzen kontinuierlich. Dies zeigt auf, dass es sich hierbei um ein Durchgangsgewebe zwischen den beiden Haupt-Komponenten der Pflanze handelt, welcher in unvorteilhaften Situation durch beispielsweise einen Abbau von Stärke (in diesem Fall der *AtTST*-Hybride) einen eigenen Anteil zur Rettung der Pflanze beiträgt (Keller, Müdsam, *et al.*, 2021). Dabei scheint das Herzgewebe diese Rolle unabhängig vom betroffenen Gewebe einzunehmen, da davon auszugehen ist, dass ein dauerhaftes Wechselspiel zwischen dem Spross und der Wurzel herrscht, abhängig vom derzeitigen durch verschiedene Faktoren bedingten Sog in Richtung des autotrophen oder heterotrophen Bereichs (Keller, Müdsam, *et al.*, 2021).

4.6 Schwellenwert-Effekte der *BvTST2;1*-Expression als Voraussetzung für die effiziente Kanalisierung von Zucker in die Wurzelvakuole

Die Untersuchungen von Zuckerrüben mit einer erhöhten *AtTST1*-Expression ergaben bereits erste Hinweise, dass eine Akkumulation von Zuckern im Wurzelgewebe nicht nur von ökonomischer Relevanz, sondern auch für eine adäquate Akklimatisierung und demnach der Etablierung einer gewissen Frosttoleranz von Bedeutung ist. Dabei ist jedoch entscheidend, dass der Sog aus dem heterotrophen Gewebe stärker ist als der Bedarf des autotrophen, sodass die in Kapitel 3.1 beschriebene kälteinduzierte *Source-Sink*-Umkehr unterdrückt wird. Da die Basis hierfür aufgrund der ubiquitären Verteilung des *AtTST1* in den entsprechenden Genotypen nur teilweise gegeben ist, wurde folglich ein Versuch gestartet den Sog in Richtung des Wurzelgewebes zu fokussieren. Hierzu wurde eine wurzelspezifische Expression des Gens des potenten tonoplastidären Saccharose-Beladers *TST2;1* anvisiert, in dem das Gen unter die Kontrolle des 2-1-48-Promoters gestellt wurde (Oltmanns *et al.*, 2006). Als Resultat dieses Ansatzes sind sechs Hybride entstanden, welche freundlicherweise für eine initiale Untersuchung im Rahmen dieser Arbeit von der KWS SAAR SE & Co KGaA zur Verfügung gestellt wurden.

Bereits an mehreren Stellen wurde offengelegt, dass die *Source-Sink*-Umkehr nicht primär durch Eintritt der Kälte, sondern durch eine Verschiebung des durch den in der Gesamt-Pflanze herrschenden Zucker-Gradienten begründeten Sog initiiert wird. Dieser wird zu einem großen Teil durch die Effizienz der vakuolären Beladung bestimmt. Demnach wurde in diesem Fall zusätzlich zur Darstellung der Expression des endogenen sowie des codon-optimierten, künstlich eingebrachten Transporter-Gens die relative Expression im Spross zur Pfahlwurzel dargestellt (Abbildung 3.29). Die differenzierte Betrachtung von Genotypen mit der höchsten Wurzel-lokalisierten *TST2;1*-Expression zeigt neben den bereits beschriebenen Phänomenen als Reaktion auf eine Kälte, dass eine Kanalisierung von Zuckern in die Vakuole wiedererwartend in einer Akkumulation von Monosacchariden und nicht Disacchariden mündet (Abbildung 3.30). Dies spricht zum einen dafür, dass die codon-optimierte Variante physiologisch aktiv ist und zum anderen, dass saure Invertasen, anders als durch zuvor postuliert, auch in Zuckerrüben durch Kälte und/oder Frost aktiviert werden (Stitt und Hurry, 2002).

Weitere Genotypen, welche ebenfalls ein erhöhtes *TST2;1*-Expression-Level in der Wurzel aufweisen, eröffnen ein anderes Bild, da der Zucker bei diesen nicht sehr effizient in der Rübe gehalten werden kann (Abbildung 3.31). Dies deutet auf die Existenz einer Art Expressions-Schwellenwert an, der zur Aktivierung des Transport-Proteins überschritten

werden muss. Dabei sind verschiedene Szenarien denkbar. Eine mögliche Erklärung könnten posttranslationale Aktivatoren mit einer ähnlichen Wirkweise wie beispielsweise die Kinase AtVik sein, welche mittels einer Phosphorylierung des AtTST1-Loops zu einer Aktivierung desselbigen führt, die ebenfalls erst durch weitere Faktoren wie der subzellulären Zuckerverteilung beeinflusst werden und dadurch den Schwellenwert formen (Wingenter *et al.*, 2011). Zusätzlich zur Annahme eines Schwellenwertes ist ein starker Anstieg an Spross-lokalisierter Saccharose im Genotyp 8709 zu beobachten, was womöglich an der hohen Abundanz des endogenen *TST2;1*-Gens liegt. Dies zeigt erneut, dass eine ausschließliche Fokussierung auf die Kanalisierung der Saccharose in das Wurzelgewebe nicht ausreicht um das globale Ziel der Synthese einer kältetoleranten Zuckerrübe, welche selbst unter diesen Bedingungen der *Source-Sink*-Umkehr trotz und den Zucker in der Rübe hält. Einerseits konnte durch die Analyse der in diesem Kapitel im Fokus stehenden Genotypen bestätigt werden, dass eine über einen unbekannten Schwellenwert hinaus intensivierte Zuckerbeladung der Vakuole spezifisch im Wurzelgewebe zu einer Arretierung der Zucker in ebendiesem Gewebe führt, dafür jedoch der Sog aus dem Spross gering gehalten werden muss. Andererseits liegt der gespeicherte Zucker hauptsächlich in Form von Monosacchariden vor, was bei der Isolierung des raffinierten Zuckers problematisch werden könnte.

4.7 Chilling Lektionen: So lernen Zuckerrüben, mit der Kälte umzugehen

Zusammenfassend zeigen die bisher diskutierten Ergebnisse, dass einige Weichen gestellt werden müssen um eine adäquate Kälteantwort zu erreichen. Neben dem bereits beschriebenen Wechselspiel zwischen dem Blatt- und Wurzelgewebe, welche unter Umständen beide sowohl eine *Source*- als auch *Sink*-Identität annehmen können, entscheidet ebenfalls das Wechselspiel zwischen Stärke- vs. Saccharose-metabolisierende Prozesse sowie das Verhältnis von Mono- zu Disacchariden über die Ausrichtung der Kälteantwort.

Da sich die bisherigen Untersuchungen lediglich auf einzelne Transporter und korrespondierende Mutanten und weniger auf die generelle Antwort der Zuckerrübe auf Kälte fokussieren, werden im Folgenden die einzelnen Prozesse einzeln dargestellt, um potenzielle Stellschrauben oder – dem Titel dieser Arbeit entsprechend – Lektionen für die Zuckerrübe identifizieren zu können.

4.7.1 Lektion N° 1 – Zuckerakkumulation als Schutzstrategie

Die Akkumulation von Zucker ist eine der wichtigsten Anpassungsstrategien der Zuckerrübe und anderer Pflanzen an Kälte. Neben der Funktion als Energiespeicher dient der Zucker als Osmolyt und schützt die Zellen vor Schädigungen durch niedrige Temperaturen. Besonders die Vakuole spielt eine entscheidende Rolle, da sie als Hauptspeicher für Zucker fungiert. Die

Regulation vakuolärer Transporter, wie beispielsweise BvSUT4, BvTST2;1 und BvIMP2, ist essenziell für die Feinststeuerung dieser Prozesse. Interessanterweise zeigt sich unter Kälte ebenfalls eine verstärkte Aktivierung saurer Invertasen, die die Umwandlung von Saccharose in Monosaccharide katalysieren. Dies erhöht das osmotische Potenzial und trägt zur Zellstabilität bei. Die kombinierte Wirkung dieser Mechanismen ermöglicht es der Zuckerrübe, die physiologische Integrität ihrer Zellen unter widrigen Bedingungen aufrechtzuerhalten. Die Lektion lautet demnach, Zucker nicht nur als Energiereserve zu betrachten, sondern ihn gezielt als Schutzschild gegen Umweltstress einzusetzen.

4.7.2 Lektion N° 2 – Balance zwischen *Source* und *Sink*

Die Transporter, die am Zuckerstoffwechsel beteiligt sind, spielen nicht nur bei der subzellulären Verteilung der verschiedenen Zucker-Spezies eine Rolle, sondern beeinflussen auch den Langstreckentransport, sodass sowohl intrazelluläre als auch organspezifische Funktionen flexibel an veränderte Bedingungen angepasst werden können.

So kann die Zuckerrübe unter Kälte die Verteilung ihrer Zuckerreserven flexibel anpassen. Während die Pfahlwurzel im normalen Wachstumsverlauf primär als Speicherorgan fungiert, wird sie unter Kälte zu einer Quelle (*Source*), während der Spross vermehrt als *Sink*-Organ auftritt. Dieser Prozess, der durch eine Umkehr des Phloem-Massenstroms begleitet wird, stellt eine bisher unbekannte Anpassungsstrategie an niedrige Temperaturen dar.

Der Transport von Zuckern entlang der Langstrecke wird durch eine Reihe weiterer, nicht vakuolärer Transporter reguliert, darunter SWEET12 und SWEET13 für die Entladung der Phloem-Parenchym-Transfer-Zellen sowie SUT1 für die Phloembeladung. Die TST-Transporter übernehmen die subzelluläre Saccharose- und Hexoseverlagerung und -speicherung. Diese Mechanismen könnten nicht nur der kurzfristigen Anpassung an Kälte dienen, sondern auch als Vorbereitung auf die kälteinduzierte Blüte (Vernalisation) fungieren. Die Lektion lautet demnach, Ressourcen dynamisch zu reorganisieren und flexibel auf äußere Einflüsse zu reagieren.

4.7.3 Lektion N° 3 – Reproduktionsstrategien unter Stress

Die kälteinduzierte Blüte ist eine zentrale Strategie vieler Pflanzen, um ungünstige Bedingungen durch eine beschleunigte Reproduktion zu umgehen. Während dies aus evolutionärer Sicht von Vorteil ist, stellt es aus landwirtschaftlicher Perspektive eine Herausforderung dar, da es die zweijährige Anzucht der Zuckerrübe erschwert und somit die Zuckerproduktion begrenzt. Die Zuckerrübe investiert unter Kälteeinfluss gezielt ihre Ressourcen in die generative Phase, indem sie gespeicherte Zucker vermehrt in den Spross umleitet.

Regulatorisch entscheidend für diesen Prozess ist die Mobilisierung von Kohlenhydraten in Richtung der Blütenbildung. Hierbei spielen spezialisierte Phloem-Transporter, aber auch intrazellulär agierende Carrier eine wesentliche Rolle. Eine gezielte Modulation bestimmter Transportprozesse könnte dazu beitragen, diesen Prozess zu beeinflussen und die Speicherphase der Zuckerrübe zu verlängern. Dies würde nicht nur neue Strategien zur Verbesserung der Winterhärte ermöglichen, sondern durch die mögliche Verlängerung der Wachstumsphase auch den Zuckerertrag steigern. Diese Erkenntnisse verdeutlichen, dass die Pflanze nicht nur auf kurzfristige Stresssituationen reagiert, sondern durch koordinierte Regulationsmechanismen langfristige Entwicklungsstrategien verfolgt.

4.7.4 Lektion N° 4 – Große Anpassungen beginnen im Kleinen

Die Zuckerrübe passt ihre Zuckerflüsse dynamisch an wechselnde Umweltbedingungen an. Diese Anpassung folgt keinem starren zyklischen sondern eher flexiblen Muster, der je nach Umweltbedingungen unterschiedlich abläuft. Zunächst werden Zucker in der Pfahlwurzel gespeichert, um als energetische Reserve bereitzustehen. Anschließend erfolgt bei Kälte eine Umverlagerung in den Spross, begleitet durch eine gezielte Regulation der Phloem-Beladung und -Entladung mittels spezifischer Transportproteine. Diese Ressourcen werden schließlich entweder für die Blütenbildung oder zur Stabilisierung der Pflanze verwertet.

Dieser Prozess zeigt, dass subzelluläre Mechanismen weitreichende Auswirkungen auf die globale Zuckerallokation haben. Die Untersuchung dieser dynamischen Prozesse ermöglicht nicht nur ein tiefergehendes Verständnis der pflanzlichen Anpassung an Umweltstress, sondern bietet auch vielversprechende Ansatzpunkte für eine gezielte genetische Modulation mit dem Ziel der Ertragssteigerung. Die Lektion lautet demnach, dass Anpassung kein einzelnes Ereignis ist, sondern ein fortlaufender, variabler Prozess, der es der Pflanze ermöglicht, sich auf zukünftige Herausforderungen einzustellen und eine große Änderung im Kleinen beginnt.

Diese vier Lektionen zeigen, dass die Zuckerrübe nicht nur passiv auf Umweltbedingungen reagiert, sondern über fein abgestimmte Regulationsmechanismen aktiv Anpassungsstrategien entwickelt. Das Verständnis dieser Prozesse kann dazu beitragen, agronomische Strategien zu optimieren und möglicherweise zukünftige Züchtungsansätze zur Verbesserung der Resilienz gegenüber Klimastress zu liefern.

4.8 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Kälte in Zuckerrüben einen Identitätswechsel zwischen *Source*- und *Sink*-Geweben induziert, der eng mit der Regulation der Zuckerallokation und der intrazellulären Zuckerkompartimentierung verknüpft ist. Insbesondere konnte eine Umkehr des Phloem-Massenstroms nachgewiesen werden, die zur Remobilisierung von Zuckern aus der Pfahlwurzel und höchstwahrscheinlich auch zur kälteinduzierten Blühfähigkeit beiträgt.

Die Identifikation daran beteiligter Schlüsselproteine wie BvSUT4, BvTST2;1 oder BvIMP2 eröffnet neue Möglichkeiten zur gezielten Modulation der Zuckerallokation. Um eine ertragssteigernde Strategie zu entwickeln, wäre es von Vorteil, den kälteinduzierten Identitätswechsel zu unterbinden, sodass die gespeicherten Zucker in der Speicherwurzel verbleiben. Dies erfordert eine gezielte Regulation der vakuolären Beladung und Entladung in den relevanten Organen. Erste Experimente haben gezeigt, dass die Manipulation einzelner Transporter bereits einen Einfluss auf die Kälteakklimatisierung nehmen kann, jedoch scheinen zusätzliche Modulatoren eine entscheidende Rolle zu spielen. So könnten Faktoren wie beispielsweise VIK oder WAKL8 weitere relevante Stellschrauben für eine gezielte Anpassung der Zuckerhomöostase darstellen.

Neben der Regulation durch Transportproteine scheint das durch deren Aktivität beeinflusste Verhältnis von Monosacchariden zu Disacchariden ein weiterer wichtiger Faktor zu sein. Es beeinflusst das Aktivitätsniveau einzelner Zuckertransporter und könnte als regulatorischer Mechanismus zur Feinjustierung der Antwort auf verschiedene Umweltbedingungen dienen. Diese Feinjustierung könnte die Priorisierung zwischen der Stabilisierung einzelner Organe, der Gesamtpflanze oder der generativen Phase steuern. Daher reicht die einfache De- oder Aktivierung einzelner Transportproteine vermutlich nicht aus, um eine vollständige Kontrolle über die Zuckerallokation unter Kältebedingungen zu erzielen. Dennoch könnte eine potenzielle Strategie zur Stabilisierung der Zuckerhomöostase unter Kältestress die gezielte kälteinduzierte Abschaltung von SUT4 sein. Hierfür wären spezifische Untersuchungen zu geeigneten Promotoren notwendig.

Eine vielversprechendere Herangehensweise wäre die kombinierte Anpassung mehrerer Regulationsmechanismen:

- Erhöhung der SUT4-Expression im Spross (durch blattspezifischen Promotoren wie beispielsweise *Bvcab11* (Stahl *et al.*, 2004)) zur Förderung des vakuolären Zuckerexports und Weitertransports in die Wurzel

- Verstärkte Expression von TST2;1 in der Pfahlwurzel (durch wurzelspezifische Promotoren wie beispielsweise 2-1-48 (Oltmanns *et al.*, 2006)) zur gesteigerten Saccharose-Speicherung und Erhöhung des Sogs in Richtung der Wurzel
- Reduktion der Aktivität saurer Invertasen zur Erhöhung des vakuolären Saccharosegehalts der Speicherwurzel

Da eine Justierung dieser Prozesse entscheidend dafür ist, wo sich Zucker in der Pflanze ansammeln oder verbleiben, sollte zusätzlich die Phloembe- und Entladung weiter untersucht werden, um regulatorische Mechanismen besser zu verstehen. Hierbei sind Messungen der SWEET12- und 13-Abundanz unter verschiedenen Bedingungen von Interesse, der gesteigerte Einbau dieser Transporter eine Folge der Ausbildung von Zellwandinwüchsen ist, welche wiederum durch eine hohe Saccharose-Konzentration im Zytosol des Mesophylls induziert werden. Ebenso könnten Untersuchungen zur Abundanz von AKT2/3 Einblicke in die energetische Regulation des Phloemstroms bei Kälte liefern. Ein weiteres Forschungsthema stellt die funktionelle Differenzierung zwischen AtTST1 und BvIMP2 dar, insbesondere hinsichtlich ihrer unterschiedlichen Auswirkungen auf die Pflanze unter Kältebedingungen, trotz ihrer grundsätzlichen gleichen Funktion als vakuoläre Zuckerbelader. Die Identifikation spezifischer Regulatoren dieser Transporter könnte neue Ansätze für die Züchtung kälteresistenter Zuckerrüben eröffnen.

Die gewonnenen Erkenntnisse erweitern das bestehende Wissen über die Rolle des Zuckers unter Kälteeinfluss und liefern konkrete Ansatzpunkte für eine gezielte genetische Modulation. Durch eine präzise Steuerung der Zuckerflüsse könnte es gelingen, den unerwünschten Zuckerverlust aus jungen Zuckerrübenwurzeln zu reduzieren. Langfristig könnte dies zur Verbesserung der Winterhärte beitragen und neue Perspektiven für eine nachhaltige und ertragsoptimierte Nutzung dieser Kulturpflanze eröffnen.

5 Zusammenfassung

Als einzige Zuckerquelle in gemäßigten Klimazonen ist die Zuckerrübe (*Beta vulgaris*) eine Kulturpflanze von beachtlicher wirtschaftlicher Bedeutung. Während der vegetativen Wachstumsphase können ihre Pfahlwurzeln bis zu 20 % ihres Frischgewichts als Saccharose speichern. Eine Verlängerung der Speicherphase könnte den Ertrag erheblich steigern, doch die Frostempfindlichkeit des Pfahlwurzelgewebes verhindert einen zweijährigen, überwinternden Anbau.

Um die Kältereaktion der Zuckerrübe zu verstehen und Schlüsselfaktoren für die Entwicklung von Frosttoleranz zu identifizieren, wurden temperaturabhängige Proteomik-, Transkriptomik-, Photosynthese- und Stoffwechselanalysen an verschiedenen Genotypen durchgeführt. Unter Kältebedingungen akkumulierte Zucker verstärkt im Spross, obwohl die photosynthetische Kapazität nahezu vollständig reduziert wurde. Gleichzeitig wurde ein verstärkter Export von Zucker aus der Pfahlwurzel beobachtet. Dies könnte durch die Herabregulierung des pfahlwurzel-spezifischen vakuolären Saccharose-Importers BvTST2;1 bei gleichzeitiger Hochregulierung des vakuolären Exporters BvSUT4 erklärt werden, was eine gezielte Remobilisierung zuvor gespeicherter Zucker zur Folge hat. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass unter Kälteeinfluss eine Umkehr der *Source-Sink*-Identität erfolgt. Mittels radioaktiv markierter Saccharose und fluoreszierender Analoga konnte tatsächlich eine bislang unbekannte Umkehr des Phloem-Massenstroms nachgewiesen werden. Interessanterweise könnte dieser Mechanismus nicht nur für die Kälteanpassung, sondern auch für die Vernalisation (kälteinduzierte Blüte) und damit für die Blühfähigkeit von Bedeutung sein.

Zur gezielten Modulation der intrazellulären Zuckerkompartimentierung im Hinblick auf Frosttoleranz und Blühverhalten wurden transgene Linien von Arabidopsis und Zuckerrübe mit unterschiedlichen kältebedingten Zuckerflüssen untersucht. Eine erhöhte Expression des vakuolären Zuckerrüben-Exporters BvSUT4 in Arabidopsis führte zu einer verstärkten Umverlagerung von Baustoffpools in Richtung der Reproduktion, jedoch auch zu einer erhöhten Suszeptibilität gegenüber Kälte. Umgekehrt zeigte eine verstärkte Expression vakuolärer Importer, insbesondere AtTST1 in der Zuckerrübe, eine vorteilhafte Wirkung auf die Kälteakklimatisierung, da Zucker effizient in der Pfahlwurzel gespeichert wurden. Die Expression von BvIMP2 in Arabidopsis hingegen aktivierte den Langstreckentransport und kanalisiert gespeicherte Zucker in Richtung des Fortpflanzungsapparats. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass BvIMP2 primär an der Feinjustierung der globalen Zuckerallokation beteiligt ist, während AtTST1 die subzelluläre Kompartimentierung reguliert.

Die unterschiedlichen Reaktionen der vakuolären Importer-exprimierenden Pflanzen auf Kälte könnten durch zusätzliche regulatorische Mechanismen beeinflusst sein, beispielsweise durch die Aktivierung von Signalproteinen infolge eines veränderten zytosolischen Mono- zu Disaccharid-Verhältnisses. Diese Mechanismen könnten vermitteln, ob eine Pflanze in Reaktion auf Kältestress bevorzugt die Erhaltung einzelner Organe, die Stabilität der Gesamtpflanze oder – unter extremen Bedingungen – die verstärkte Investition in die generative Phase, einschließlich der Blütenbildung, priorisiert.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass Kälte einen Identitätswechsel zwischen *Source* und *Sink* induziert, der zur Vernalisation und Blühfähigkeit beiträgt. Mit dem Verständnis über diesen Prozess konnten Schlüsselfaktoren identifiziert werden, die eine gezielte Modulation dieses Prozesses ermöglichen, mit dem Ziel, den Identitätswechsel zu unterbinden und dadurch den Ertrag zu steigern.

6 Literaturverzeichnis

- Abel, S., Theologis, A. (1994). Transient transformation of Arabidopsis leaf protoplasts: A versatile experimental system to study gene expression. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology*, 5(3), 421–427. <https://doi.org/10.1111/J.1365-313X.1994.00421.X>
- Abelenda, J. A., Bergonzi, S., Oortwijn, M., Sonnewald, S., Du, M., Visser, R. G. F., Sonnewald, U., Bachem, C. W. B. (2019). Source-Sink Regulation Is Mediated by Interaction of an FT Homolog with a SWEET Protein in Potato. *Current Biology : CB*, 29(7), 1178–1186.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.02.018>
- Abou-Elwafa, S. F., Büttner, B., Chia, T., Schulze-Buxloh, G., Hohmann, U., Mutasa-Göttgens, E., Jung, C., Müller, A. E. (2011). Conservation and divergence of autonomous pathway genes in the flowering regulatory network of Beta vulgaris. *Journal of Experimental Botany*, 62(10), 3359–3374. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq321>
- Abou-Elwafa, S. F., Büttner, B., Kopisch-Obuch, F. J., Jung, C., Müller, A. E. (2012). Genetic identification of a novel bolting locus in Beta vulgaris which promotes annuality independently of the bolting gene B. *Molecular Breeding*, 29(4), 989–998. <https://doi.org/10.1007/s11032-011-9671-x>
- Afoufa-Bastien, D., Medici, A., Jeauffre, J., Coutos-Thévenot, P., Lemoine, R., Atanassova, R., Laloi, M. (2010). The Vitis vinifera sugar transporter gene family: Phylogenetic overview and macroarray expression profiling. *BMC Plant Biology*, 10(1), 245. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-245>
- Aguero, T., Newman, K., King, M. L. (2018). Microinjection of Xenopus Oocytes. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2018(2). <https://doi.org/10.1101/pdb.prot096974>
- Alberdi, M., Corcuera, L. J. (1991). Cold Acclimation in Plants. *Phytochemistry*, 30(10), 3177–3184. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(91\)83172-H](https://doi.org/10.1016/0031-9422(91)83172-H)
- Aluri, S., Büttner, M. (2007). Identification and functional expression of the Arabidopsis thaliana vacuolar glucose transporter 1 and its role in seed germination and flowering. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(7), 2537–2542. <https://doi.org/10.1073/pnas.0610278104>
- Anders, S., Huber, W. (2010). Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biology*, 11(10), R106. <https://doi.org/10.1186/gb-2010-11-10-r106>
- Asada, K. (1999). THE WATER-WATER CYCLE IN CHLOROPLASTS: Scavenging of Active Oxygens and Dissipation of Excess Photons. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 50(1), 601–639. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.ARPLANT.50.1.601>
- Babst, B. A., Braun, D. M., Karve, A. A., Frank Baker, R., Tran, T. M., Kenny, D. J., Rohlfhill, J., Knoblauch, J., Knoblauch, M., Lohaus, G., Tappero, R., Scherzer, S., Hedrich, R., Jensen, K. H. (2022). Sugar loading is not required for phloem sap flow in maize plants. *Nature Plants*, 8(2), 171–180. <https://doi.org/10.1038/s41477-022-01098-x>
- Bachmann, M., Matile, P., Keller, F. (1994). Metabolism of the Raffinose Family Oligosaccharides in Leaves of Ajuga reptans L. Cold Acclimation, Translocation, and Sink to Source Transition: Discovery of Chain Elongation Enzyme. *Plant Physiology*, 105(4), 1335–1345. <http://www.jstor.org/stable/4275988>
- Berardini, T. Z., Reiser, L., Li, D., Mezheritsky, Y., Muller, R., Strait, E., Huala, E. (2015). The Arabidopsis information resource: Making and mining the “gold standard” annotated reference plant genome. *Genesis (New York, N.Y. : 2000)*, 53(8), 474–485. <https://doi.org/10.1002/dvg.22877>

- Bogdanović, J., Mojović, M., Milosavić, N., Mitrović, A., Vucinić, Z., Spasojević, I. (2008).** Role of fructose in the adaptation of plants to cold-induced oxidative stress. *European Biophysics Journal*, 37(7), 1241–1246. <https://doi.org/10.1007/s00249-008-0260-9>
- Boller, T., Wiemken, A. (1986).** Dynamics of Vacuolar Compartmentation. *Annual Review of Plant Physiology*, 37(1), 137–164. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.37.060186.001033>
- Bouche-Pillon, S., Fleurat-Lessard, P., Fromont, J. C., Serrano, R., Bonnemain, J. L. (1994).** Immunolocalization of the Plasma Membrane H⁺-ATPase in Minor Veins of *Vicia faba* in Relation to Phloem Loading. *Plant Physiology*, 105(2), 691–697. <https://doi.org/10.1104/pp.105.2.691>
- Boudry, P., McCombie, H., van Dijk, H. (2002).** Vernalization requirement of wild beet *Beta vulgaris* ssp. *maritima* : among population variation and its adaptive significance. *Journal of Ecology*, 90(4), 693–703. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2745.2002.00704.x>
- Bräutigam, K., Dietzel, L., Kleine, T., Ströher, E., Wormuth, D., Dietz, K.-J., Radke, D., Wirtz, M., Hell, R., Dörmann, P., Nunes-Nesi, A., Schauer, N., Fernie, A. R., Oliver, S. N., Geigenberger, P., Leister, D., Pfannschmidt, T. (2009).** Dynamic plastid redox signals integrate gene expression and metabolism to induce distinct metabolic states in photosynthetic acclimation in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 21(9), 2715–2732. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.062018>
- Broccanello, C., Stevanato, P., Biscarini, F., Cantu, D., Saccomani, M. (2015).** A new polymorphism on chromosome 6 associated with bolting tendency in sugar beet. *BMC Genetics*, 16(1), 142. <https://doi.org/10.1186/s12863-015-0300-2>
- Chardon, F., Bedu, M., Calenge, F., Klemens, P. A. W., Spinner, L., Clement, G., Chietera, G., Lérans, S., Ferrand, M., Lacombe, B., Loudet, O., Dinant, S., Bellini, C., Neuhaus, H. E., Daniel-Vedele, F., Krapp, A. (2013).** Leaf fructose content is controlled by the vacuolar transporter SWEET17 in *Arabidopsis*. *Current Biology : CB*, 23(8), 697–702. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.03.021>
- Chen, L.-Q., Hou, B.-H., Lalonde, S., Takanaga, H., Hartung, M. L., Qu, X.-Q., Guo, W.-J., Kim, J.-G., Underwood, W., Chaudhuri, B., Chermak, D., Antony, G., White, F. F., Somerville, S. C., Mudgett, M. B., Frommer, W. B. (2010).** Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens. *Nature*, 468(7323), 527–532. <https://doi.org/10.1038/nature09606>
- Chen, L.-Q., Qu, X.-Q., Hou, B.-H., Sosso, D., Osorio, S., Fernie, A. R., Frommer, W. B. (2012).** Sucrose efflux mediated by SWEET proteins as a key step for phloem transport. *Science*, 335(6065), 207–211. <https://doi.org/10.1126/science.1213351>
- Chérel, I., Gaillard, I. (2019).** The Complex Fine-Tuning of K⁺ Fluxes in Plants in Relation to Osmotic and Ionic Abiotic Stresses. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(3). <https://doi.org/10.3390/ijms20030715>
- Cho, J.-I., Burla, B., Lee, D.-W., Ryoo, N., Hong, S.-K., Kim, H.-B., Eom, J.-S., Choi, S.-B., Cho, M.-H., Bhoo, S. H., Hahn, T.-R., Neuhaus, H. E., Martinoia, E., Jeon, J.-S. (2010).** Expression analysis and functional characterization of the monosaccharide transporters, OsTMTs, involving vacuolar sugar transport in rice (*Oryza sativa*). *New Phytologist*, 186(3), 657–668. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03194.x>
- Choudhury, F. K., Rivero, R. M., Blumwald, E., Mittler, R. (2017).** Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination. *The Plant Journal*, 90(5), 856–867. <https://doi.org/10.1111/tpj.13299>
- Coruzzi, G. M., Zhou, L (2001).** Carbon and nitrogen sensing and signaling in plants: Emerging ‘matrix effects’. *Current Opinion in Plant Biology*, 4(3), 247–253. [https://doi.org/10.1016/s1369-5266\(00\)00168-0](https://doi.org/10.1016/s1369-5266(00)00168-0)

- Crosatti, C., Rizza, F., Badeck, F. W., Mazzucotelli, E., Cattivelli, L. (2013). Harden the chloroplast to protect the plant. *Physiologia Plantarum*, 147(1), 55–63. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2012.01689.x>
- Dally, N., Xiao, K., Holtgräwe, D., Jung, C. (2014). The B2 flowering time locus of beet encodes a zinc finger transcription factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(28), 10365–10370. <https://doi.org/10.1073/pnas.1404829111>
- Deeken, R., Geiger, D., Fromm, J., Koroleva, O., Ache, P., Langenfeld-Heyser, R., Sauer, N., May, S. T., Hedrich, R. (2002). Loss of the AKT2/3 potassium channel affects sugar loading into the phloem of Arabidopsis. *Planta*, 216(2), 334–344. <https://doi.org/10.1007/s00425-002-0895-1>
- DeepL SE (2024). DeepL Translator. <https://www.deepl.com>
- Deng, J., Yang, X., Sun, W., Miao, Y., He, L., Zhang, X. (2020). The Calcium Sensor CBL2 and Its Interacting Kinase CIPK6 Are Involved in Plant Sugar Homeostasis via Interacting with Tonoplast Sugar Transporter TST2. *Plant Physiology*, 183(1), 236–249. <https://doi.org/10.1104/pp.19.01368>
- DeWitt, N. D., Harper, J. F., Sussman, M. R. (1991). Evidence for a plasma membrane proton pump in phloem cells of higher plants. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology*, 1(1), 121–128. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.1991.00121.x>
- DeWitt, N. D., Sussman, M. R. (1995). Immunocytological localization of an epitope-tagged plasma membrane proton pump (H(+)-ATPase) in phloem companion cells. *The Plant Cell*, 7(12), 2053–2067. <https://doi.org/10.1105/tpc.7.12.2053>
- Dohm, J. C., Minoche, A. E., Holtgräwe, D., Capella-Gutiérrez, S., Zakrzewski, F., Tafer, H., Rupp, O., Sørensen, T. R., Stracke, R., Reinhardt, R., Goesmann, A., Kraft, T., Schulz, B., Stadler, P. F., Schmidt, T., Gabaldón, T., Lehrach, H., Weisshaar, B., Himmelbauer, H. (2014). The genome of the recently domesticated crop plant sugar beet (*Beta vulgaris*). *Nature*, 505(7484), 546–549. <https://doi.org/10.1038/nature12817>
- Dreyer, I., Gomez-Porras, J. L., Riedelsberger, J. (2017). The potassium battery: A mobile energy source for transport processes in plant vascular tissues. *The New Phytologist*, 216(4), 1049–1053. <https://doi.org/10.1111/nph.14667>
- Eom, J.-S., Chen, L.-Q., Sosso, D., Julius, B. T., Lin, I. W., Qu, X.-Q., Braun, D. M., Frommer, W. B. (2015). Sweets, transporters for intracellular and intercellular sugar translocation. *Current Opinion in Plant Biology*, 25, 53–62. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2015.04.005>
- Falhof, J., Pedersen, J. T., Fuglsang, A. T., Palmgren, M. (2016). Plasma Membrane H(+)-ATPase Regulation in the Center of Plant Physiology. *Molecular Plant*, 9(3), 323–337. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.11.002>
- Farber, A., Young, A. J., Ruban, A. V., Horton, P., Jahns, P. (1997). Dynamics of Xanthophyll-Cycle Activity in Different Antenna Subcomplexes in the Photosynthetic Membranes of Higher Plants (The Relationship between Zeaxanthin Conversion and Nonphotochemical Fluorescence Quenching). *Plant Physiology*, 115(4), 1609–1618. <https://doi.org/10.1104/pp.115.4.1609>
- Fowler, S., Lee, K., Onouchi, H., Samach, A., Richardson, K., Morris, B., Coupland, G., Putterill, J. (1999). *Gigantea*: A circadian clock-controlled gene that regulates photoperiodic flowering in Arabidopsis and encodes a protein with several possible membrane-spanning domains. *The EMBO Journal*, 18(17), 4679–4688. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.17.4679>
- Garcia-Molina, A., Kleine, T., Schneider, K., Mühlhaus, T., Lehmann, M., Leister, D. (2020). Translational Components Contribute to Acclimation Responses to High Light, Heat, and Cold in Arabidopsis. *iScience*, 23(7), 101331. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101331>

- Garcia-Molina, A., Leister, D. (2020).** Accelerated relaxation of photoprotection impairs biomass accumulation in Arabidopsis. *Nature Plants*, 6(1), 9–12. <https://doi.org/10.1038/s41477-019-0572-z>
- Gentleman, R. C., Carey, V. J., Bates, D. M., Bolstad, B., Dettling, M., Dudoit, S., Ellis, B., Gautier, L., Ge, Y., Gentry, J., Hornik, K., Hothorn, T., Huber, W., Iacus, S., Irizarry, R., Leisch, F., Li, C., Maechler, M., Rossini, A. J., Sawitzki, G., Smith, C., Smyth, G., Tierney, L., Yang, J. Y. H., Zhang, J. (2004).** Bioconductor: Open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biology*, 5(10), R80. <https://doi.org/10.1186/gb-2004-5-10-r80>
- Giaquinta, R. T. (1979a).** Phloem loading of sucrose: Involvement of membrane ATPase and proton transport. *Plant Physiology*, 63(4), 744–748. <https://doi.org/10.1104/pp.63.4.744>
- Giaquinta, R. T. (1979b).** Sucrose translocation and storage in the sugar beet. *Plant Physiology*, 63(5), 828–832. <https://doi.org/10.1104/PP.63.5.828>
- Godt, D., Roitsch, T. (2006).** The developmental and organ specific expression of sucrose cleaving enzymes in sugar beet suggests a transition between apoplastic and symplasmic phloem unloading in the tap roots. *Plant Physiology and Biochemistry*, 44(11-12), 656–665. <https://doi.org/10.1016/J.PLAPHY.2006.09.019>
- Gollan, P. J., Lima-Melo, Y., Tiwari, A., Tikkanen, M., Aro, E.-M. (2017).** Interaction between photosynthetic electron transport and chloroplast sinks triggers protection and signalling important for plant productivity. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 372(1730). <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0390>
- Goraloglia, G. S., Liu, T.-K., Zhao, L., Panipinto, P. M., Groover, E. D., Bains, Y. S., Imaizumi, T. (2017).** Cycling DOF FACTOR 1 represses transcription through the TOPLESS co-repressor to control photoperiodic flowering in Arabidopsis. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology*, 92(2), 244–262. <https://doi.org/10.1111/tpj.13649>
- Guo, W.-J., Nagy, R., Chen, H.-Y., Pfrunder, S., Yu, Y.-C., Santelia, D., Frommer, W. B., Martinoia, E. (2014).** Sweet17, a facilitative transporter, mediates fructose transport across the tonoplast of Arabidopsis roots and leaves. *Plant Physiology*, 164(2), 777–789. <https://doi.org/10.1104/pp.113.232751>
- Haferkamp, I., Linka, N. (2012).** Functional expression and characterisation of membrane transport proteins. *Plant Biology*, 14(5), 675–690. <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2012.00591.x>
- Hedrich, R., Sauer, N., Neuhaus, H. E. (2015).** Sugar transport across the plant vacuolar membrane: Nature and regulation of carrier proteins. *Current Opinion in Plant Biology*, 25, 63–70. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2015.04.008>
- Henderson, P. J. (1991).** Sugar transport proteins. *Current Opinion in Structural Biology*, 1(4), 590–601. [https://doi.org/10.1016/S0959-440X\(05\)80082-X](https://doi.org/10.1016/S0959-440X(05)80082-X)
- Hesse, H., Sonnewald, U., Willmitzer, L. (1995).** Cloning and expression analysis of sucrose-phosphate synthase from sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Molecular & General Genetics : MGG*, 247(4), 515–520. <https://doi.org/10.1007/BF00293155>
- Hincha, D. K., Zuther, E., Heyer, A. G. (2003).** The preservation of liposomes by raffinose family oligosaccharides during drying is mediated by effects on fusion and lipid phase transitions. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1612(2), 172–177. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(03\)00116-0](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(03)00116-0)
- Hoermiller, I. I., Naegele, T., Augustin, H., Stutz, S., Weckwerth, W., Heyer, A. G. (2017).** Subcellular reprogramming of metabolism during cold acclimation in Arabidopsis thaliana. *Plant, Cell & Environment*, 40(5), 602–610. <https://doi.org/10.1111/pce.12836>

- Hoffmann, C. M., Kenter, C. (2018). Yield Potential of Sugar Beet - Have We Hit the Ceiling? *Frontiers in Plant Science*, 9, 289. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00289>
- Hoffmann, C. M., Kluge-Severin, S. (2011). Growth analysis of autumn and spring sown sugar beet. *European Journal of Agronomy*, 34(1), 1–9. <https://doi.org/10.1016/J.EJA.2010.09.001>
- Horst, R. J., Doehlemann, G., Wahl, R., Hofmann, J., Schmiedl, A., Kahmann, R., Kämper, J., Sonnewald, U., Voll, L. M. (2010). Ustilago maydis infection strongly alters organic nitrogen allocation in maize and stimulates productivity of systemic source leaves. *Plant Physiology*, 152(1), 293–308. <https://doi.org/10.1104/pp.109.147702>
- Huber, S. C., Huber, J. L. (1992). Role of sucrose-phosphate synthase in sucrose metabolism in leaves. *Plant Physiology*, 99(4), 1275–1278. <https://doi.org/10.1104/PP.99.4.1275>
- Huner, N. P., Oquist, G., Hurry, V. M., Krol, M., Falk, S., Griffith, M. (1993). Photosynthesis, photoinhibition and low temperature acclimation in cold tolerant plants. *Photosynthesis Research*, 37(1), 19–39. <https://doi.org/10.1007/BF02185436>
- Hussain, H. A., Hussain, S., Khaliq, A., Ashraf, U., Anjum, S. A., Men, S., Wang, L. (2018). Chilling and Drought Stresses in Crop Plants: Implications, Cross Talk, and Potential Management Opportunities. *Frontiers in Plant Science*, 9, 393. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00393>
- Jaggard, K. W., Qi, A., Ober, E. S. (2009). Capture and use of solar radiation, water, and nitrogen by sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Journal of Experimental Botany*, 60(7), 1919–1925. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp110>
- Jan, N., Ul-Hussain, M., Andrabi, K. I. (2009). Cold resistance in plants: A mystery unresolved. *Electronic Journal of Biotechnology*, 12(3). <https://doi.org/10.2225/vol12-issue3-full3>
- Janda, T., Majláth, I., Szalai, G. (2014). Interaction of Temperature and Light in the Development of Freezing Tolerance in Plants. *Journal of Plant Growth Regulation*, 33(2), 460–469. <https://doi.org/10.1007/s00344-013-9381-1>
- Julius, B. T., Leach, K. A., Tran, T. M., Mertz, R. A., Braun, D. M. (2017). Sugar Transporters in Plants: New Insights and Discoveries. *Plant and Cell Physiology*, 58(9), 1442–1460. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcx090>
- Jung, B., Ludewig, F., Schulz, A., Meißner, G., Wöstefeld, N., Flügge, U.-I., Pommerrenig, B., Wirsching, P., Sauer, N., Koch, W., Sommer, F., Mühlhaus, T., Schroda, M., Cuin, T. A., Graus, D., Marten, I., Hedrich, R., Neuhaus, H. E. (2015). Identification of the transporter responsible for sucrose accumulation in sugar beet taproots. *Nature Plants*, 1(1), 14001. <https://doi.org/10.1038/nplants.2014.1>
- Karimi, M., Inzé, D., Depicker, A. (2002). Gateway vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Trends in Plant Science*, 7(5), 193–195. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(02\)02251-3](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(02)02251-3)
- Keller, I., Martins Rodrigues, C., Neuhaus, H. E., Pommerrenig, B. (2021). Improved resource allocation and stabilization of yield under abiotic stress. *Journal of Plant Physiology*, 257, 153336. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2020.153336>
- Keller, I., Müdsam, C., Martins Rodrigues, C., Kischka, D., Zierer, W., Sonnewald, U., Harms, K., Czarnecki, O., Fiedler-Wiechers, K., Koch, W., Neuhaus, H. E., Ludewig, F., Pommerrenig, B. (2021). Cold-Triggered Induction of ROS- and Raffinose Metabolism in Freezing-Sensitive Taproot Tissue of Sugar Beet. *Frontiers in Plant Science*, 12, 715767. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.715767>
- Khan, A., Cheng, J., Kitashova, A., Fürtauer, L., Nägele, T., Picco, C., Scholz-Starke, J., Keller, I., Neuhaus, H. E., Pommerrenig, B. (2023). Vacuolar sugar transporter EARLY RESPONSE TO DEHYDRATION6-LIKE4 affects fructose signaling and plant growth. *Plant Physiology*, 193(3), 2141–2163. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiad403>

- Klemens, P. A. W., Patzke, K., Deitmer, J., Spinner, L., Le Hir, R., Bellini, C., Bedu, M., Chardon, F., Krapp, A., Neuhaus, H. E. (2013). Overexpression of the vacuolar sugar carrier AtSWEET16 modifies germination, growth, and stress tolerance in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 163(3), 1338–1352. <https://doi.org/10.1104/pp.113.224972>
- Klemens, P. A. W., Patzke, K., Trentmann, O., Poschet, G., Büttner, M., Schulz, A., Marten, I., Hedrich, R., Neuhaus, H. E. (2014). Overexpression of a proton-coupled vacuolar glucose exporter impairs freezing tolerance and seed germination. *New Phytologist*, 202(1), 188–197. <https://doi.org/10.1111/nph.12642>
- Knoblauch, M., Knoblauch, J., Mullendore, D. L., Savage, J. A., Babst, B. A., Beecher, S. D., Dodgen, A. C., Jensen, K. H., Holbrook, N. M. (2016). Testing the Münch hypothesis of long distance phloem transport in plants. *ELife*, 5. <https://doi.org/10.7554/eLife.15341>
- Knoblauch, M., Vendrell, M., Leau, E. de, Paterlini, A., Knox, K., Ross-Elliott, T., Reinders, A., Brockman, S. A., Ward, J. M., Oparka, K. (2015). Multispectral phloem-mobile probes: Properties and applications. *Plant Physiology*, 167(4), 1211–1220. <https://doi.org/10.1104/pp.114.255414>
- Koressaar, T., Remm, M. (2007). Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics*, 23(10), 1289–1291. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm091>
- Kovtun, Y., Daie, J. (1995). End-Product Control of Carbon Metabolism in Culture-Grown Sugar Beet Plants (Molecular and Physiological Evidence on Accelerated Leaf Development and Enhanced Gene Expression). *Plant Physiology*, 108(4), 1647–1656. <https://doi.org/10.1104/pp.108.4.1647>
- Krapp, A., Hofmann, B., Schäfer, C., Stitt, M. (1993). Regulation of the expression of rbc S and other photosynthetic genes by carbohydrates: a mechanism for the 'sink regulation' of photosynthesis? *The Plant Journal*, 3(6), 817–828. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113X.1993.00817.x>
- Kühn, C., Quick, W. P., Schulz, A., Riesmeier, J. W., Sonnewald, U., Frommer, W. B. (1996). Companion cell-specific inhibition of the potato sucrose transporter SUT1. *Plant, Cell & Environment*, 19(10), 1115–1123. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.1996.tb00426.x>
- Lag, M. A., Meza-Basso, L., Fernández, J., Cristi, R., Romero, M. (1991). Lipid composition of chloroplasts from cold-acclimated and non-acclimated *Nothofagus dombeyi*. *Phytochemistry*, 30(3), 763–768. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(91\)85248-X](https://doi.org/10.1016/0031-9422(91)85248-X)
- Leigh, R. A., Wyn Jones, R. G. (1984). A hypothesis relating critical potassium concentrations for growth to the distribution and functions of this ion in the plant cell. *New Phytologist*, 97(1), 1–13. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1984.tb04103.x>
- Lemoine, R., La Camera, S., Atanassova, R., Dédaldéchamp, F., Allario, T., Pourtau, N., Bonnemain, J.-L., Laloi, M., Coutos-Thévenot, P., Maurousset, L., Faucher, M., Grousseau, C., Lemonnier, P., Parrilla, J., Durand, M. (2013). Source-to-sink transport of sugar and regulation by environmental factors. *Frontiers in Plant Science*, 4, 272. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00272>
- Lichthardt, C., Chen, T.-W., Stahl, A., Stützel, H. (2019). Co-Evolution of Sink and Source in the Recent Breeding History of Winter Wheat in Germany. *Frontiers in Plant Science*, 10, 1771. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01771>
- Lineberger, D. R., Steponkus, P. L. (1980). Cryoprotection by glucose, sucrose, and raffinose to chloroplast thylakoids. *Plant Physiology*, 65(2), 298–304. <https://doi.org/10.1104/pp.65.2.298>
- Livak, K. J., Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)*, 25(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>

- Love, M. I., Huber, W., Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, 15(12), 550. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>
- Marschner, H. (2011). *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants*. Academic Press.
- Martin, T., Frommer, W. B., Salanoubat, M., Willmitzer, L. (1993). Expression of an Arabidopsis sucrose synthase gene indicates a role in metabolization of sucrose both during phloem loading and in sink organs. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology*, 4(2), 367–377. <https://doi.org/10.1046/J.1365-313X.1993.04020367.X>
- Martinoia, E., Maeshima, M., Neuhaus, H. E. (2007). Vacuolar transporters and their essential role in plant metabolism. *Journal of Experimental Botany*, 58(1), 83–102. <https://doi.org/10.1093/jxb/erl183>
- Martins Rodrigues, C., Müdsam, C., Keller, I., Zierer, W., Czarnecki, O., Corral, J. M., Reinhardt, F., Nieberl, P., Fiedler-Wiechers, K., Sommer, F., Schroda, M., Mühlhaus, T., Harms, K., Flügge, U.-I., Sonnewald, U., Koch, W., Ludewig, F., Neuhaus, H. E., Pommerrenig, B. (2020). Vernalization Alters Sink and Source Identities and Reverses Phloem Translocation from Taproots to Shoots in Sugar Beet. *The Plant Cell*, 32(10), 3206–3223. <https://doi.org/10.1105/tpc.20.00072>
- McCubbin, T. J., Braun, D. M. (2020). Unraveling the puzzle of phloem parenchyma transfer cell wall ingrowth. *Journal of Experimental Botany*, 71(16), 4617–4620. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa311>
- Meier, U. (2018). *Growth stages of mono- and dicotyledonous plants: Bbch Monograph*. <https://doi.org/10.5073/20180906-074619>
- Metsalu, T., Vilo, J. (2015). Clustvis: A web tool for visualizing clustering of multivariate data using Principal Component Analysis and heatmap. *Nucleic Acids Research*, 43(W1), W566–70. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv468>
- Microsoft Corporation (2023). Microsoft Office. <https://www.microsoft.com/de-de/microsoft-365>
- Milford, G. F. J., Riley, J. (1980). The effects of temperature on leaf growth of sugar beet varieties. *Annals of Applied Biology*, 94(3), 431–443. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1980.tb03959.x>
- Moellering, E. R., Muthan, B., Benning, C. (2010). Freezing tolerance in plants requires lipid remodeling at the outer chloroplast membrane. *Science*, 330(6001), 226–228. <https://doi.org/10.1126/science.1191803>
- Moore, B., Zhou, L., Rolland, F., Hall, Q., Cheng, W.-H., Liu, Y.-X., Hwang, I., Jones, T., Sheen, J. (2003). Role of the Arabidopsis glucose sensor HXK1 in nutrient, light, and hormonal signaling. *Science (New York, N. Y.)*, 300(5617), 332–336. <https://doi.org/10.1126/science.1080585>
- Münch, E. (1930). Die Stoffbewegungen in der Pflanze. (No Title). <https://cir.nii.ac.jp/crid/1130000793658371456>
- Mutasa-Göttgens, E. S., Qi, A., Zhang, W., Schulze-Buxloh, G., Jennings, A., Hohmann, U., Müller, A. E., Hedden, P. (2010). Bolting and flowering control in sugar beet: Relationships and effects of gibberellin, the bolting gene B and vernalization. *AoB PLANTS*, 2010, plq012. <https://doi.org/10.1093/aobpla/plq012>
- Nägele, T., Heyer, A. G. (2013). Approximating subcellular organisation of carbohydrate metabolism during cold acclimation in different natural accessions of Arabidopsis thaliana. *New Phytologist*, 198(3), 777–787. <https://doi.org/10.1111/nph.12201>
- Navarro, C., Abelenda, J. A., Cruz-Oró, E., Cuéllar, C. A., Tamaki, S., Silva, J., Shimamoto, K., Prat, S. (2011). Control of flowering and storage organ formation in potato by FLOWERING LOCUS T. *Nature*, 478(7367), 119–122. <https://doi.org/10.1038/nature10431>

- Nieberl, P., Ehrl, C., Pommerrenig, B., Graus, D., Marten, I., Jung, B., Ludewig, F., Koch, W., Harms, K., Flügge, U.-I., Neuhaus, H. E., Hedrich, R., Sauer, N. (2017). Functional characterisation and cell specificity of BvSUT1, the transporter that loads sucrose into the phloem of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) source leaves. *Plant Biology (Stuttgart, Germany)*, 19(3), 315–326. <https://doi.org/10.1111/plb.12546>
- Nunes-Nesi, A., Fernie, A. R., Stitt, M. (2010). Metabolic and signaling aspects underpinning the regulation of plant carbon nitrogen interactions. *Molecular Plant*, 3(6), 973–996. <https://doi.org/10.1093/mp/ssq049>
- Oltmanns, H., Kloos, D. U., Briess, W., Pflugmacher, M., Stahl, D. J., Hehl, R. (2006). Taproot promoters cause tissue specific gene expression within the storage root of sugar beet. *Planta*, 224(3), 485–495. <https://doi.org/10.1007/s00425-006-0230-3>
- OpenAI (2024). ChatGPT (GPT-4). <https://openai.com/chatgpt>
- OriginLab Corporation (2021). OriginPro (Version 2021). <https://www.originlab.com>
- Patzke, K., Prananingrum, P., Klemens, P. A. W., Trentmann, O., Martins Rodrigues, C., Keller, I., Fernie, A. R., Geigenberger, P., Bölter, B., Lehmann, M., Schmitz-Esser, S., Pommerrenig, B., Haferkamp, I., Neuhaus, H. E. (2019). The Plastidic Sugar Transporter pSuT Influences Flowering and Affects Cold Responses. *Plant Physiology*, 179(2), 569–587. <https://doi.org/10.1104/pp.18.01036>
- Pfeiffer, N., Tränkner, C., Lemnian, I., Grosse, I., Müller, A. E., Jung, C., Kopisch-Obuch, F. J. (2014). Genetic analysis of bolting after winter in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 127(11), 2479–2489. <https://doi.org/10.1007/s00122-014-2392-x>
- Pin, P. A., Zhang, W., Vogt, S. H., Dally, N., Büttner, B., Schulze-Buxloh, G., Jelly, N. S., Chia, T. Y. P., Mutasa-Göttgens, E. S., Dohm, J. C., Himmelbauer, H., Weisshaar, B., Kraus, J., Gielen, J. J. L., Lommel, M., Weyens, G., Wahl, B., Schechert, A., Nilsson, O., Jung, C., Kraft, T., Müller, A. E. (2012). The role of a pseudo-response regulator gene in life cycle adaptation and domestication of beet. *Current Biology : CB*, 22(12), 1095–1101. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.04.007>
- Pommerrenig, B., Ludewig, F., Cvetkovic, J., Trentmann, O., Klemens, P. A. W., Neuhaus, H. E. (2018). In Concert: Orchestrated Changes in Carbohydrate Homeostasis Are Critical for Plant Abiotic Stress Tolerance. *Plant and Cell Physiology*, 59(7), 1290–1299. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcy037>
- Pommerrenig, B., Müdsam, C., Kischka, D., Neuhaus, H. E. (2020). Treat and trick: Common regulation and manipulation of sugar transporters during sink establishment by the plant and the pathogen. *Journal of Experimental Botany*, 71(14), 3930–3940. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa168>
- Poschet, G., Hannich, B., Raab, S., Jungkunz, I., Klemens, P. A. W., Krueger, S., Wic, S., Neuhaus, H. E., Büttner, M. (2011). A novel Arabidopsis vacuolar glucose exporter is involved in cellular sugar homeostasis and affects the composition of seed storage compounds. *Plant Physiology*, 157(4), 1664–1676. <https://doi.org/10.1104/pp.111.186825>
- Qian, Z., He, L., Li, F. (2024). Understanding cold stress response mechanisms in plants: An overview. *Frontiers in Plant Science*, 15, 1443317. <https://doi.org/10.3389/fpls.2024.1443317>
- R Core Team (2017). R: A language and environment for statistical computing. <https://www.R-project.org>
- Ramon, M., Rolland, F., Sheen, J. (2008). Sugar sensing and signaling. *The Arabidopsis Book*, 6, e0117. <https://doi.org/10.1199/tab.0117>

- Rekarte-Cowie, I., Ebshish, O. S., Mohamed, K. S., Pearce, R. S. (2008).** Sucrose helps regulate cold acclimation of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, 59(15), 4205–4217. <https://doi.org/10.1093/jxb/ern262>
- Reynolds, M., Foulkes, M. J., Slafer, G. A., Berry, P., Parry, M. A. J., Snape, J. W., Angus, W. J. (2009).** Raising yield potential in wheat. *Journal of Experimental Botany*, 60(7), 1899–1918. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp016>
- Ritz, C., Pipper, C., Yndgaard, F., Fredlund, K., Steinrücken, G. (2010).** Modelling flowering of plants using time-to-event methods. *European Journal of Agronomy*, 32(2), 155–161. <https://doi.org/10.1016/J.EJA.2009.10.002>
- Rodríguez-Navarro, A. (2000).** Potassium transport in fungi and plants. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1469(1), 1–30. [https://doi.org/10.1016/S0304-4157\(99\)00013-1](https://doi.org/10.1016/S0304-4157(99)00013-1)
- Rodríguez-Navarro, A., Rubio, F. (2006).** High-affinity potassium and sodium transport systems in plants. *Journal of Experimental Botany*, 57(5), 1149–1160. <https://doi.org/10.1093/jxb/erj068>
- Rolland, F., Baena-Gonzalez, E., Sheen, J. (2006).** Sugar sensing and signaling in plants: Conserved and novel mechanisms. *Annual Review of Plant Biology*, 57, 675–709. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105441>
- Rolland, F., Moore, B., Sheen, J. (2002).** Sugar sensing and signaling in plants. *The Plant Cell*, 14 Suppl(Suppl), S185-205. <https://doi.org/10.1105/tpc.010455>
- Ronquist, F., Teslenko, M., van der Mark, P., Ayres, D. L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M. A., Huelsenbeck, J. P. (2012).** Mrbayes 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*, 61(3), 539–542. <https://doi.org/10.1093/sysbio/sys029>
- Ruan, Y.-L. (2014).** Sucrose metabolism: Gateway to diverse carbon use and sugar signaling. *Annual Review of Plant Biology*, 65(1), 33–67. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050213-040251>
- Ruiz-Medrano, R., Xoconostle-Cázares, B., Lucas, W. J. (2001).** The phloem as a conduit for inter-organ communication. *Current Opinion in Plant Biology*, 4(3), 202–209. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(00\)00162-X](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(00)00162-X)
- Santarius, K. A., Milde, H. (1977).** Sugar compartmentation in frost-hardy and partially dehardened cabbage leaf cells. *Planta*, 136(2), 163–166. <https://doi.org/10.1007/BF00396193>
- Savage, J. A., Haines, D. F., Holbrook, N. M. (2015).** The making of giant pumpkins: How selective breeding changed the phloem of *Cucurbita maxima* from source to sink. *Plant, Cell & Environment*, 38(8), 1543–1554. <https://doi.org/10.1111/pce.12502>
- Schepper, V. de, Swaef, T. de, Bauweraerts, I., Steppe, K. (2013).** Phloem transport: A review of mechanisms and controls. *Journal of Experimental Botany*, 64(16), 4839–4850. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert302>
- 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(2), 325–336. <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2011.00506.x>
- Schulz, A., Beyhl, D., Marten, I., Wormit, A., Neuhaus, H. 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(1), 129–136. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04672.x>
- Schulze, W. X., Schneider, T., Starck, S., Martinoia, E., Trentmann, O. (2012).** Cold acclimation induces changes in *Arabidopsis* tonoplast protein abundance and activity and alters phosphorylation of tonoplast monosaccharide transporters. *The Plant Journal*, 69(3), 529–541. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04812.x>

- Schwenkert, S., Fernie, A. R., Geigenberger, P., Leister, D., Möhlmann, T., Naranjo, B., Neuhaus, H. E. (2022). Chloroplasts are key players to cope with light and temperature stress. *Trends in Plant Science*, 27(6), 577–587. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2021.12.004>
- Shabala, S., Pottosin, I. (2014). Regulation of potassium transport in plants under hostile conditions: Implications for abiotic and biotic stress tolerance. *Physiologia Plantarum*, 151(3), 257–279. <https://doi.org/10.1111/ppl.12165>
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T. J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Söding, J., Thompson, J. D., Higgins, D. G. (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular Systems Biology*, 7(1), 539. <https://doi.org/10.1038/msb.2011.75>
- Sigel, E. (1990). Use of *Xenopus* oocytes for the functional expression of plasma membrane proteins. *The Journal of Membrane Biology*, 117(3), 201–221. <https://doi.org/10.1007/bf01868451>
- Sigel, E., Minier, F. (2005). The *Xenopus* oocyte: System for the study of functional expression and modulation of proteins. *Molecular Nutrition & Food Research*, 49(3), 228–234. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200400104>
- Slewinski, T. L. (2011). Diverse functional roles of monosaccharide transporters and their homologs in vascular plants: A physiological perspective. *Molecular Plant*, 4(4), 641–662. <https://doi.org/10.1093/mp/ssr051>
- Smallwood, M., Bowles, D. J. (2002). Plants in a cold climate. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 357(1423), 831–847. <https://doi.org/10.1098/rstb.2002.1073>
- Smith, A. M., Zeeman, S. C., Smith, S. M. (2005). Starch degradation. *Annual Review of Plant Biology*, 56, 73–98. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.56.032604.144257>
- Soualiou, S., Duan, F., Li, X., Zhou, W. (2022). Crop PRODUCTION UNDER COLD STRESS: An understanding of plant responses, acclimation processes, and management strategies. *Plant Physiology and Biochemistry : PPB*, 190, 47–61. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2022.08.024>
- Sparkes, I. A., Runions, J., Kearns, A., Hawes, C. (2006). Rapid, transient expression of fluorescent fusion proteins in tobacco plants and generation of stably transformed plants. *Nature Protocols*, 1(4), 2019–2025. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.286>
- Stahl, D. J., Kloos, D. U., Hehl, R. (2004). A sugar beet chlorophyll a/b binding protein promoter void of G-box like elements confers strong and leaf specific reporter gene expression in transgenic sugar beet. *BMC Biotechnology*, 4(1). <https://doi.org/10.1186/1472-6750-4-31>
- Steponkus, P. L. (1971). Cold Acclimation of *Hedera helix*: Evidence for a Two Phase Process. *Plant Physiology*, 47(2), 175–180. <https://doi.org/10.1104/PP.47.2.175>
- Steponkus, P. L. (1984). Role of the Plasma Membrane in Freezing Injury and Cold Acclimation. *Annual Review of Plant Physiology*, 35(1), 543–584. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.35.060184.002551>
- Stitt, M., Hurry, V. M. (2002). A plant for all seasons: Alterations in photosynthetic carbon metabolism during cold acclimation in *Arabidopsis*. *Current Opinion in Plant Biology*, 5(3), 199–206. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(02\)00258-3](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(02)00258-3)
- Stitt, M., Lilley, R. M., Gerhardt, R., Heldt, H. W. (1989) [32] Metabolite levels in specific cells and subcellular compartments of plant leaves. *Methods in Enzymology*, Vol. 174. Academic Press, 518–552. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(89\)74035-0](https://doi.org/10.1016/0076-6879(89)74035-0)
- Strand, Å., Foyer, C. H., Gustaffson, P., Gardeström, P. [P.], Hurry, V. (2003). Altering flux through the sucrose biosynthesis pathway in transgenic *Arabidopsis thaliana* modifies photosynthetic

- acclimation at low temperatures and the development of freezing tolerance. *Plant, Cell & Environment*, 26(4), 523–535. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2003.00983.x>
- Strand, Å., Hurry, V. M., Gustafsson, P., Gardeström, P [Per] (1997).** Development of *Arabidopsis thaliana* leaves at low temperatures releases the suppression of photosynthesis and photosynthetic gene expression despite the accumulation of soluble carbohydrates. *The Plant Journal*, 12(3), 605–614. <https://doi.org/10.1111/j.0960-7412.1997.00605.x>
- Strand, Å., Hurry, V. M., Henkes, S., Huner, N., Gustafsson, P., Gardeström, P [Per], Stitt, M. (1999).** Acclimation of *Arabidopsis* leaves developing at low temperatures. Increasing cytoplasmic volume accompanies increased activities of enzymes in the Calvin cycle and in the sucrose-biosynthesis pathway. *Plant Physiology*, 119(4), 1387–1398. <https://doi.org/10.1104/pp.119.4.1387>
- Streb, S., Zeeman, S. C. (2012).** Starch metabolism in *Arabidopsis*. *The Arabidopsis Book*, 10, e0160. <https://doi.org/10.1199/tab.0160>
- Sturm, A. (1996).** Molecular characterization and functional analysis of sucrose-cleaving enzymes in carrot (*Daucus carota* L.). *Journal of Experimental Botany*, 47 Spec No(Special_Issue), 1187–1192. https://doi.org/10.1093/jxb/47.Special_Issue.1187
- Suzuki, N., Mittler, R. (2006).** Reactive oxygen species and temperature stresses: A delicate balance between signaling and destruction. *Physiologia Plantarum*, 126(1), 45–51. <https://doi.org/10.1111/J.0031-9317.2005.00582.X>
- Swiss Academic Software GmbH (2024).** Citavi – Literaturverwaltung und Wissensorganisation. <https://www.citavi.com>
- Taiz, L., Møller, I. M., Murphy, A., Zeiger, E. (2023).** *Plant physiology and development* (International seventh edition). Oxford University Press; Sinauer Associates.
- Tarkowski, Ł. P., van den Ende, W. (2015).** Cold tolerance triggered by soluble sugars: A multifaceted countermeasure. *Frontiers in Plant Science*, 6, 203. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00203>
- Tegeder, M., Hammes, U. Z. (2018).** The way out and in: Phloem loading and unloading of amino acids. *Current Opinion in Plant Biology*, 43, 16–21. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2017.12.002>
- Thomashow, M. F. (1999).** Plant Cold Acclimation: Freezing Tolerance Genes and Regulatory Mechanisms. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 50, 571–599. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.50.1.571>
- Thomashow, M. F. (2001).** So what's new in the field of plant cold acclimation? Lots! *Plant Physiology*, 125(1), 89–93. <https://doi.org/10.1104/pp.125.1.89>
- Tränkner, C., Pfeiffer, N., Kirchhoff, M., Kopisch-Obuch, F. J., van Dijk, H., Schilhabel, M., Hasler, M., Emrani, N. (2017).** Deciphering the complex nature of bolting time regulation in *Beta vulgaris*. *Theoretical and Applied Genetics*, 130(8), 1649–1667. <https://doi.org/10.1007/s00122-017-2916-2>
- Trentmann, O., Mühlhaus, T., Zimmer, D., Sommer, F., Schroda, M., Haferkamp, I., Keller, I., Pommerrenig, B., Neuhaus, H. E. (2020).** Identification of Chloroplast Envelope Proteins with Critical Importance for Cold Acclimation. *Plant Physiology*, 182(3), 1239–1255. <https://doi.org/10.1104/pp.19.00947>
- Turesson, H., Andersson, M., Marttila, S., Thulin, I., Hofvander, P. (2014).** Starch biosynthetic genes and enzymes are expressed and active in the absence of starch accumulation in sugar beet tap-root. *BMC Plant Biology*, 14(1), 104. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-14-104>
- Turgeon, R., Wolf, S. (2009).** Phloem transport: Cellular pathways and molecular trafficking. *Annual Review of Plant Biology*, 60, 207–221. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.043008.092045>

- Vainstein, A., Fisher, M., Ziv, M. (1993). Applicability of Reporter Genes to Carnation Transformation. *HortScience*, 28(11), 1122–1124. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.28.11.1122>
- Valifard, M., Le Hir, R., Müller, J., Scheuring, D., Neuhaus, H. E., Pommerrenig, B. (2021). Vacuolar fructose transporter SWEET17 is critical for root development and drought tolerance. *Plant Physiology*, 187(4), 2716–2730. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiab436>
- Volkert, K., Debast, S., Voll, L. M., Voll, H., Schiefl, I., Hofmann, J., Schneider, S., Börnke, F. (2014). Loss of the two major leaf isoforms of sucrose-phosphate synthase in *Arabidopsis thaliana* limits sucrose synthesis and nocturnal starch degradation but does not alter carbon partitioning during photosynthesis. *Journal of Experimental Botany*, 65(18), 5217–5229. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru282>
- Vu, D. P., Martins Rodrigues, C., Jung, B., Meissner, G., Klemens, P. A. W., Holtgräwe, D., Fürtauer, L., Nägele, T., Nieberl, P., Pommerrenig, B., Neuhaus, H. E. (2020). Vacuolar sucrose homeostasis is critical for plant development, seed properties, and night-time survival in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, 71(16), 4930–4943. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa205>
- Wang, M., Zheng, Q., Shen, Q., Guo, S. (2013). The critical role of potassium in plant stress response. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(4), 7370–7390. <https://doi.org/10.3390/ijms14047370>
- Wei, X., Nguyen, S. T. T., Collings, D. A., McCurdy, D. W. (2020). Sucrose regulates wall ingrowth deposition in phloem parenchyma transfer cells in *Arabidopsis* via affecting phloem loading activity. *Journal of Experimental Botany*, 71(16), 4690–4702. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa246>
- Weigel, D., Glazebrook, J. (2002). *Arabidopsis: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor. *The Quarterly Review of Biology*, 77(3), 330–331. <https://doi.org/10.1086/345202>
- Weise, A., Barker, L., Kühn, C., Lalonde, S., Buschmann, H., Frommer, W. B., Ward, J. M. (2000). A new subfamily of sucrose transporters, SUT4, with low affinity/high capacity localized in enucleate sieve elements of plants. *The Plant Cell*, 12(8), 1345–1355. <https://doi.org/10.1105/tpc.12.8.1345>
- Wingenter, K., Schulz, A., Wormit, A., Wic, S., Trentmann, O., Hoermiller, I. I., Heyer, A. G., Marten, I., Hedrich, R., Neuhaus, H. E. (2010). Increased activity of the vacuolar monosaccharide transporter TMT1 alters cellular sugar partitioning, sugar signaling, and seed yield in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 154(2), 665–677. <https://doi.org/10.1104/pp.110.162040>
- Wingenter, K., Trentmann, O., Wünsch, I., Hörmiller, I. I., Heyer, A. G., Reinders, J., Schulz, A., Geiger, D., Hedrich, R., Neuhaus, H. E. (2011). A member of the mitogen-activated protein 3-kinase family is involved in the regulation of plant vacuolar glucose uptake. *The Plant Journal*, 68(5), 890–900. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04739.x>
- Wolfe, J., Bryant, G. (1999). Freezing, drying, and/or vitrification of membrane- solute-water systems. *Cryobiology*, 39(2), 103–129. <https://doi.org/10.1006/CRYO.1999.2195>
- Wormit, A., Trentmann, O., Feifer, I., Lohr, C., Tjaden, J., Meyer, S., Schmidt, U., Martinoia, E., Neuhaus, H. E. (2006). Molecular identification and physiological characterization of a novel monosaccharide transporter from *Arabidopsis* involved in vacuolar sugar transport. *The Plant Cell*, 18(12), 3476–3490. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.047290>
- Xin, Z., Browse, J. (2000). Cold comfort farm: the acclimation of plants to freezing temperatures. *Plant, Cell & Environment*, 23(9), 893–902. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2000.00611.x>
- Xu, Q., Yin, S., Ma, Y., Song, M., Song, Y., Mu, S., Li, Y., Liu, X., Ren, Y., Gao, C., Chen, S., Liesche, J. (2020). Carbon export from leaves is controlled via ubiquitination and phosphorylation of sucrose transporter SUC2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(11), 6223–6230. <https://doi.org/10.1073/pnas.1912754117>

- Yadav, S. K. (2010).** Cold stress tolerance mechanisms in plants. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 30(3), 515–527. <https://doi.org/10.1051/agro/2009050>
- Zeeman, S. C., Kossmann, J., Smith, A. M. (2010).** Starch: Its metabolism, evolution, and biotechnological modification in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 61, 209–234. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112301>
- Zeeman, S. C., Smith, S. M., Smith, A. M. (2007).** The diurnal metabolism of leaf starch. *Biochemical Journal*, 401(1), 13–28. <https://doi.org/10.1042/BJ20061393>
- Zuther, E., Büchel, K., Hundertmark, M., Stitt, M., Hinch, D. K., Heyer, A. G. (2004).** The role of raffinose in the cold acclimation response of *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters*, 576(1-2), 169–173. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.09.006>

7 Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1.1 VERTEILUNG DES ZUCKERS IN PFLANZEN.	2
ABBILDUNG 1.2 VAKUOLÄRE ZUCKERTRANSPORTER UND PROTONENPUMPEN.	6
ABBILDUNG 2.1 VERSUCHSAUFBAU ZUR MESSUNG DER ELEKTRISCHEN LEITFÄHIGKEIT VON ARABIDOPSIS-BLÄTTERN.	12
ABBILDUNG 2.2 VERSUCHSAUFBAU ZUR MESSUNG DER ELEKTRISCHEN LEITFÄHIGKEIT VON ZUCKERRÜBENGeweBE. ...	13
ABBILDUNG 2.3 VORRICHTUNG (PULLER) ZUR HERSTELLUNG VON INJEKTIONSNADELN.....	18
ABBILDUNG 3.1 BIOMASSE UND ZUCKERGEHALTE KÄLTEBEHANDELTEN ZUCKERRÜBENBLÄTTERN UND PFAHLWURZELN.	31
ABBILDUNG 3.2 PHOTOSYNTHETISCHE PARAMETER, CO ₂ -ASSIMILATION UND EXPRESSIONSDATEN IN ZUCKERRÜBENBLÄTTERN NACH KÄLTEEXPOSITION.	34
ABBILDUNG 3.3 VERÄNDERUNGEN DES HAUPTKOHLENHYDRATSTOFFWECHSELS UND DES ENERGIEZUSTANDES ALS REAKTION AUF KÄLTEEINWIRKUNG.	37
ABBILDUNG 3.4 VERTEILUNG VON ¹⁴ C-SACCHAROSE UND ESCULIN IN BLÄTTERN.	41
ABBILDUNG 3.5 KÄLTEABHÄNGIGE AKKUMULATION VON <i>TST2;1</i> UND <i>SUT4</i> IN DREI VERSCHIEDENEN ZUCKERRÜBENGENTYPEN.	43
ABBILDUNG 3.6 EXPRESSION VON BLÜTENREGULATOR-GENEN	45
ABBILDUNG 3.7 BLÜHENDE ZUCKERRÜBEN	46
ABBILDUNG 3.8 ZUCKER- UND TEMPERATUR-ABHÄNGIGES <i>BvSUT4</i> -EXPRESSIONSMUSTER.	48
ABBILDUNG 3.9 BIOMASSE UND ZUCKERGEHALT KÄLTEBEHANDELTEN ARABIDOPSIS-ROSETTEN.	51
ABBILDUNG 3.10 FROSTTOLERANZ KÄLTEBEHANDELTEN ARABIDOPSIS-ROSETTEN.	52
ABBILDUNG 3.11 EXPRESSION VON ZUCKER-SENSITIVEN GENEN.....	53
ABBILDUNG 3.12 ANALYSE DES BLÜHVERHALTENS UND SAMENGEWICHTS.	54
ABBILDUNG 3.13 IONEN-GEHALT KÄLTEBEHANDELTEN ARABIDOPSIS-ROSETTEN.	56
ABBILDUNG 3.14 CARBONSÄURE-GEHALT KÄLTEBEHANDELTEN ARABIDOPSIS-ROSETTEN.	57
ABBILDUNG 3.15 INITIALE CHARAKTERISIERUNG DES <i>BvIMP2</i> -TRANSPORTERS.	59
ABBILDUNG 3.16 ZUCKER- UND TEMPERATUR-ABHÄNGIGES <i>BvIMP2</i> -EXPRESSIONSMUSTER.....	60
ABBILDUNG 3.17 BIOMASSE UND ZUCKERGEHALT KÄLTEBEHANDELTEN ARABIDOPSIS-ROSETTEN.	62
ABBILDUNG 3.18 FROSTTOLERANZ KÄLTEBEHANDELTEN ARABIDOPSIS-ROSETTEN.	63
ABBILDUNG 3.19 EXPRESSION ZUCKER-SENSITIVEN GENE.	64
ABBILDUNG 3.20 AUSWIRKUNGEN EINER VERÄNDERTEN VAKUOLENBEFÜLLUNG AUF DEN LANGSTRECKENTRANSPORT.	65
ABBILDUNG 3.21 EXPRESSION UND ZUCKERDYNAMIK NACH BLATTABDUNKELUNG.	66
ABBILDUNG 3.22 ANALYSE DER BLÜTENSTAND-ENTWICKLUNG.	67
ABBILDUNG 3.23 IONEN-GEHALT KÄLTEBEHANDELTEN ARABIDOPSIS-ROSETTEN.	68
ABBILDUNG 3.24 CARBONSÄURE-GEHALT KÄLTEBEHANDELTEN ARABIDOPSIS-ROSETTEN.	69

ABBILDUNG 3.25 EXPRESSIONSANALYSEN.....	70
ABBILDUNG 3.26 BIOMASSE UND ZUCKERGEHALT KÄLTEBEHANDELTEN ZUCKERRÜBENBLÄTTER UND PFAHLWURZELN.	71
ABBILDUNG 3.27 FROSTANALYSEN.	72
ABBILDUNG 3.28 ZUCKER-KOMPOSITION DER FROSTBEDINGT AUSTRETENDEN FLÜSSIGKEIT.	73
ABBILDUNG 3.29 GEWEBSSPEZIFISCHE <i>BVTST2;1</i> - EXPRESSION.....	74
ABBILDUNG 3.30 WASSER UND ZUCKERGEHALT KÄLTEBEHANDELTEN ZUCKERRÜBENBLÄTTER UND PFAHLWURZELN...	76
ABBILDUNG 3.31 WASSER UND ZUCKERGEHALT KÄLTEBEHANDELTEN ZUCKERRÜBENBLÄTTER UND PFAHLWURZELN...	77
ABBILDUNG 4.1 SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES KÄLTEINDUZIERTEN ÜBERGANGS VON <i>SINK</i> ZU <i>SOURCE</i>	80

7.2 Tabellenverzeichnis

TABELLE 1.1	VERWENDETE PFLANZEN-LINIEN.....	9
TABELLE 1.2	ZUSAMMENSETZUNG EINES QPCR-ANSATZES	25
TABELLE 1.3	STANDARD-QPCR-PROGRAMM.....	25
TABELLE 1.4	VERWENDETE PRIMER.	25
TABELLE 1.5	GEN-IDENTIFIKATOREN.	27

7.3 Abkürzungsverzeichnis

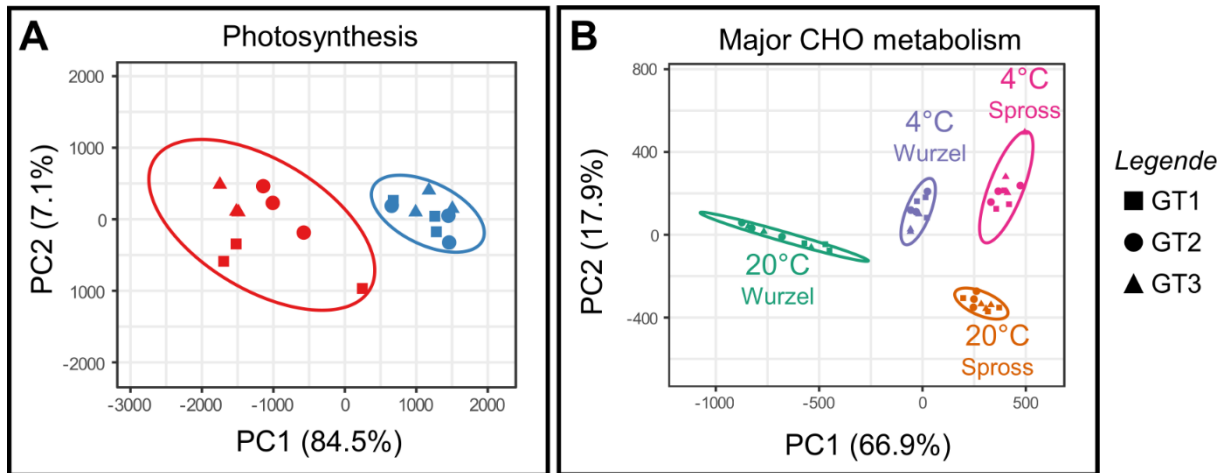
%	Prozent
% (v/v)	Gewichtsprozent
% (v/w)	Volumenprozent
°C	Grad Celsius
μ	Mikro
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μmol	Mikromol
¹⁴ C	natürliches radioaktives Kohlenstoffisotop
ADP	Adenosindiphosphat
AS	Aminosäuren
At	<i>Arabidopsis thaliana</i>
At	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ATP	Adenosintriphosphat
<i>B. vulgaris</i>	Zuckerrübe
BBX	B-box-containing protein
BF	Bright Field; Durchlicht
BMBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung
bp	Basenpaare
BTC1	Bolting Time Control
Bv	<i>Beta vulgaris</i> ; Zuckerrübe
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
CAB	Chlorophyll a/b bindendes Protein
CaCl ₂	Kalziumchlorid
CaMV	Cauliflower Mosaic Virus
CDF1	Cycling Dof Factor
cDNA	complementary DNA; komplementäre DNA
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COL	Constans-Like
cpm	counts per minute (Radioaktivität); counts per million (RNA-Seq)
d	Schichtdicke
Da	Dalton
ddH ₂ O	doppel destilliertes Wasser

DEG	differentiell exprimierten Gene
DNA	Deoxyribonucleic acid; Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
E	Extinktion
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>et al.</i>	und andere
F6P	Fructose-6-Phosphat
FB	F-Box Protein
FDR	False Discovery Rate
FG	Frischgewicht
FL	Flowering Locus
FLK	Flowering Locus KH domain
Frc	Fruktose
FT	Flowering Locus T
FVE	Flowering Locus VE
g	gramm
g	Erdbeschleunigung
GFP	grün fluoreszierende Protein
Glc	Glukose
GT	Genotyp
h	Stunde
H ⁺	Proton
H ₂ O	Wasser
HCl	Salzsäure
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazin-1-ethansulfonsäure
HPLC	High Performance Liquid Chromatography; Hochleistungsflüssigkeits- chromatographie
Hv	<i>Hordeum vulgare</i> ; Gerste
HXK1	Hexokinase
IC	Ionenaustauschchromatographie
IMP2	Integral Membrane Protein
K ₂ O	Kaliumoxid
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KOH	Kaliumhydroxid
KWS	Kleinwanzlebener Saatzucht
l	Liter

LFQ	<i>Label-Free Quantitation</i> ; Markierungsfreie Quantifizierung
log2FC	log 2 fold change
M	Molar
m	Milli
M	Mega
mCi	Millicurie
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minuten
mm	Millimeter
mRNA	messenger RNA; Boten-RNA
MS	Massenspektrometrie
N	Stickstoff
n	nano
<i>N. benthamiana</i>	<i>Nicotiana benthamiana</i>
NaCl	Natriumchlorid
NAD ⁺	Nicotinamidadenindinukleotid (oxidiert)
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid (reduziert)
O-R2	Oocyte Reagent 2
P ₂ O ₅	Phosphorpentoxid
Pa	Pascal
PAM	Pulse Amplitude Modulation
PAR	photosynthetisch aktive Strahlung
PC	Plastocyanin
PCA	<i>Principal Component Analysis</i> ; Hauptkomponentenanalyse
PCR	polymerase chain reaction; Polymerase-Kettenreaktion
PET	photosynthetischen Elektronentransportkette
pH	potentia hydrogenii; Potential des Wasserstoffs
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
ppm	parts per million
PS	Photosynthese
PSII	Photosystem II
qPCR	quantitative real time PCR; quantitative Echtzeit-PCR
RCA	Rubisco-Aktivase
RCBS	Rubisco small subunit
RNA	ribonucleic acid; Ribonukleinsäure
rpm	revolutions per minute
RubisCO	Ribulose-1,5-Bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase

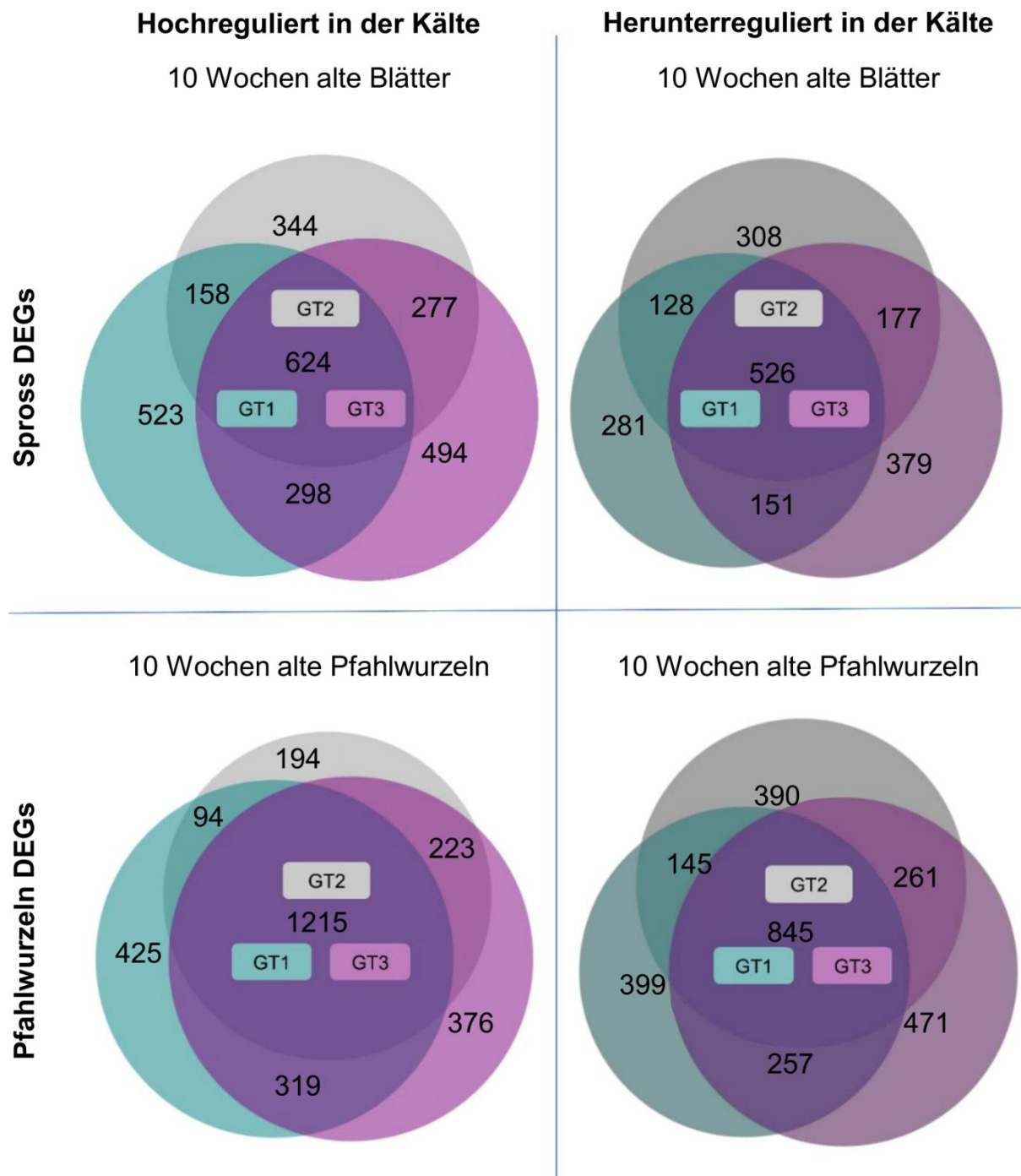
s	Sekunde
SA	Standardabweichung
Sof	<i>Saccharum officinarum</i>
SPS	Saccharose-Phosphat-Synthase
St	<i>Solanum tuberosum</i> ; Kartoffel
Suc	Saccharose
SUC2	Sucrose-Proton Symporter 2
SUS	Saccharose-Synthase
SUT	Sucrose Transporter
SWEET	Sugar Will Eventually be Exported
TG	Trockengewicht
TST	Tonoplast Sugar Transporter
U	Unit
UDP	Uridindiphosphat
USA	United States of America; Vereinigte Staaten von Amerika
WAKL	Wall-associated receptor kinase-like
WT	Wildtyp
xy	Xylem
Y(II)	effektive Quantenausbeute
Y(NO)	regulierte Wärmeabstrahlung
Y(NPQ)	nicht-regulierte Energieabstrahlung
YFP	yellow fluorescent protein
z.B.	zum Beispiel
α	Alpha
ε	mikromolarer Extinktionskoeffizient

7.4 Ergänzende Abbildungen



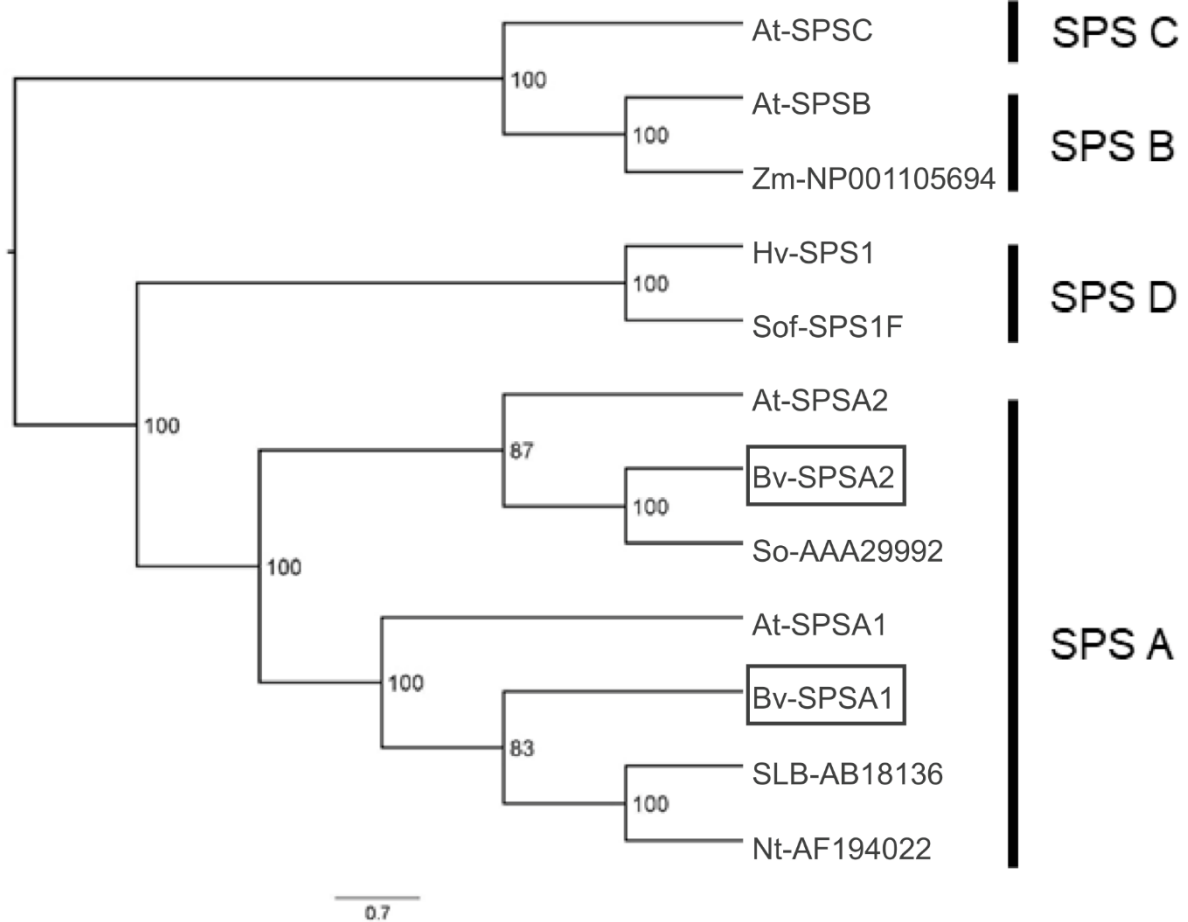
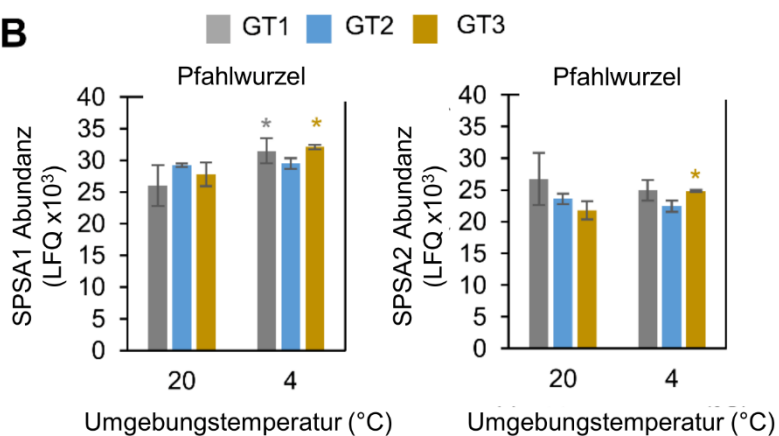
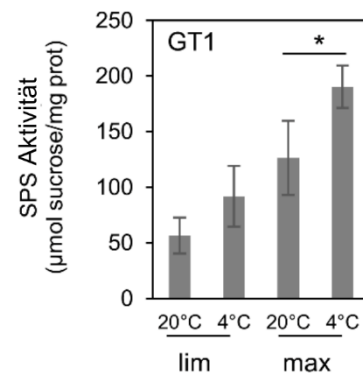
Ergänzende Abbildung 1. Hauptkomponentenanalyse (PC1 vs. PC2) für drei Genotypen.

(A) Hauptkomponentenanalyse (*Principal Component Analysis*; PCA) basierend auf den Expressionswerten von 162 photosyntheserelevanten Genen, extrahiert aus RNA-Seq-Daten von *Source*-Blättern von Zuckerrüben, die bei 20 °C kultiviert und entweder 14 Tage lang einer Kältebehandlung bei 4 °C oder weiterhin Kontrollbedingungen (20 °C) ausgesetzt wurden. **(B)** PCA basierend auf den Expressionswerten von 112 Genen mit der GO-Annotation "*major CHO metabolism*", extrahiert aus RNA-Seq-Daten von *Source*-Blättern von Pflanzen, die bei 20 °C kultiviert und für eine Woche bei 12 °C sowie anschließend 14 Tage bei 4 °C oder unter Kontrollbedingungen (20 °C) kultiviert wurden.



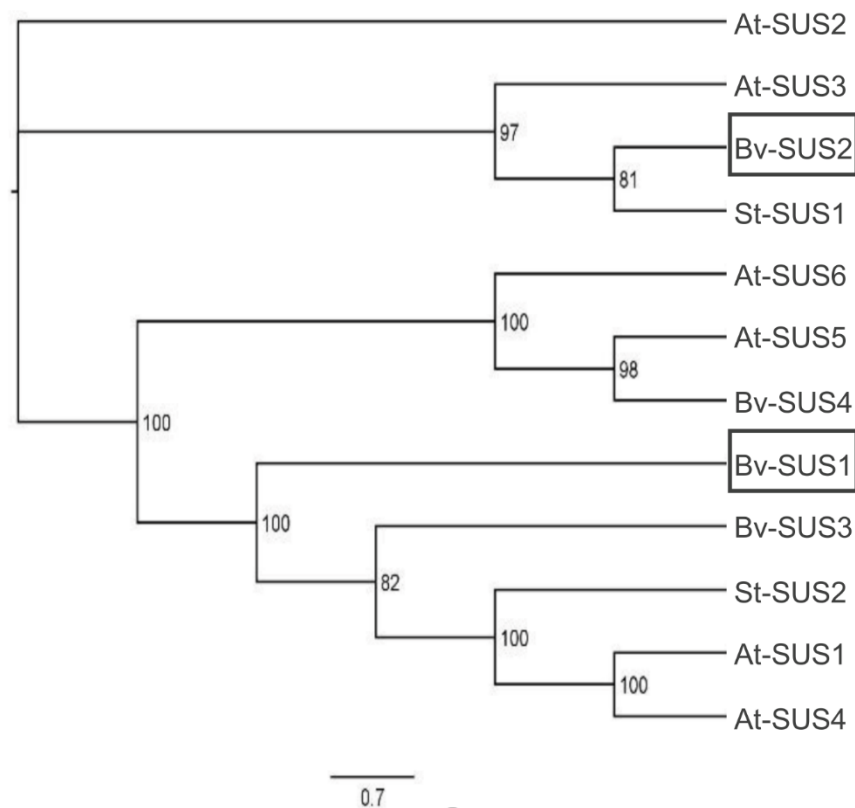
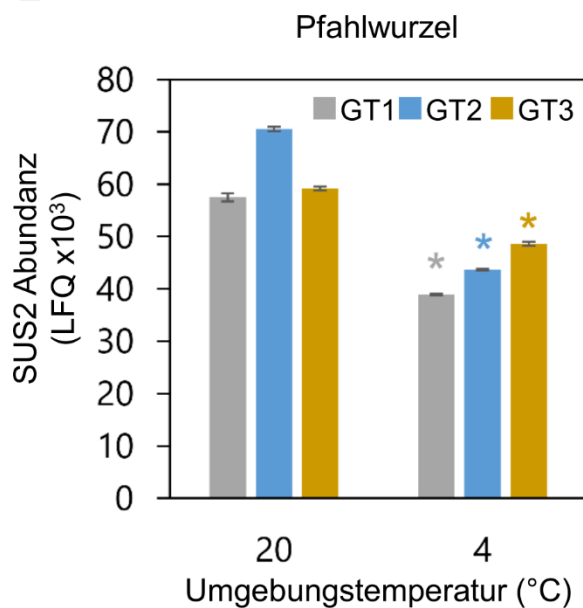
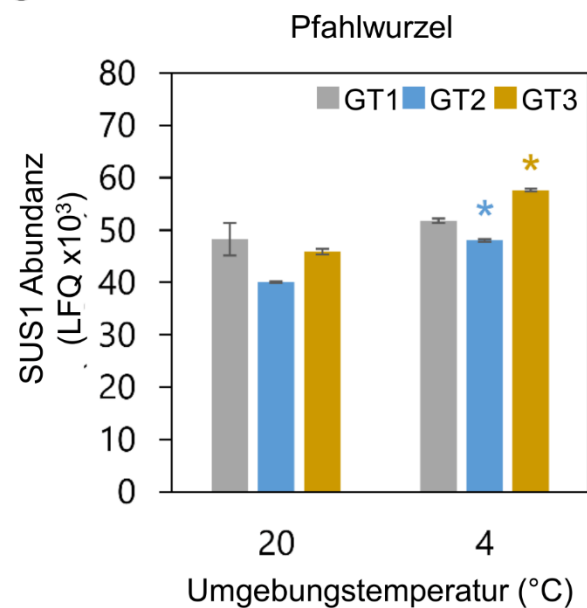
Ergänzende Abbildung 2. Venn-Diagramme der differentiell exprimierten Gene (DEGs) in Blättern und Pfahlwurzeln.

Die Anzahl der hochregulierten ($\text{Log}_2\text{-Fold-Change} \geq 1$) bzw. herunterregulierten ($\text{Log}_2\text{-Fold-Change} \leq -1$) Gene (mit $\text{FDR} \leq 0,01$) ist in den Kreisen der Venn-Diagramme angegeben. Die Gesamtanzahl der gemeinsamen DEGs (d. h. in den Schnittmengen aller Genotypen) war in den Pfahlwurzeln höher als in den Sprossen (1.215 hoch- und 845 herunterregulierte DEGs in den Pfahlwurzeln gegenüber 624 hoch- und 524 herunterregulierten in den Sprossen).

A**B****C**

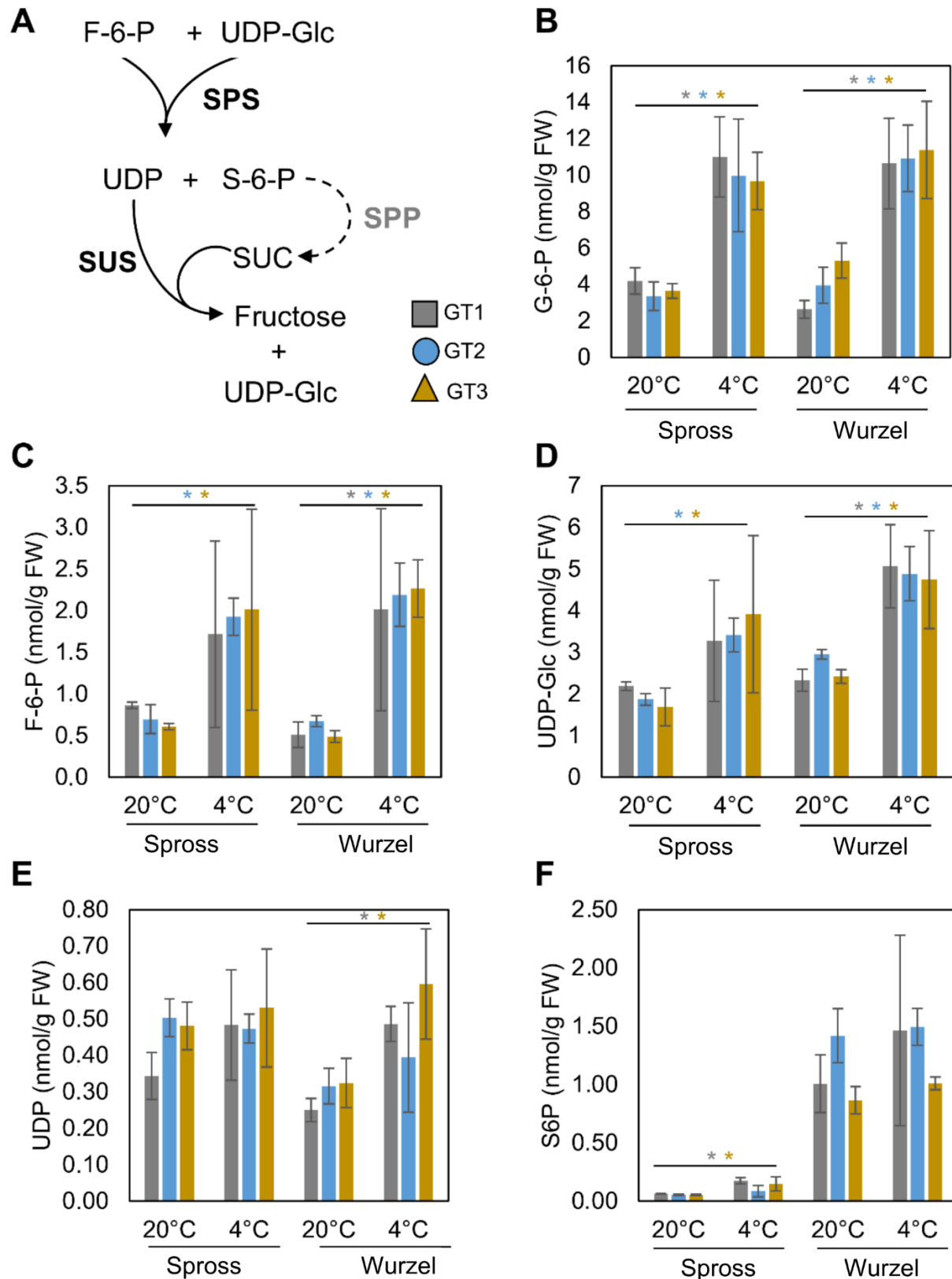
Ergänzende Abbildung 3. Phylogenie der SPS-Isoformen von *Beta vulgaris* und Proteinmengen der Bv-SPS-Isoformen in Pfahlwurzeln.

(A) Phylogenetische Analyse der BvSPS-Proteine. **(B)** Proteinmengen von SPSA1 und SPSA2 basierend auf MS-Counts (LFQ-Werte) aus GT1, GT2 und GT3. **(C)** SPS-Aktivität in Wurzeln unter Substrat (F6P)-limitierenden (lim) und maximalen (max) Bedingungen.

A**B****C**

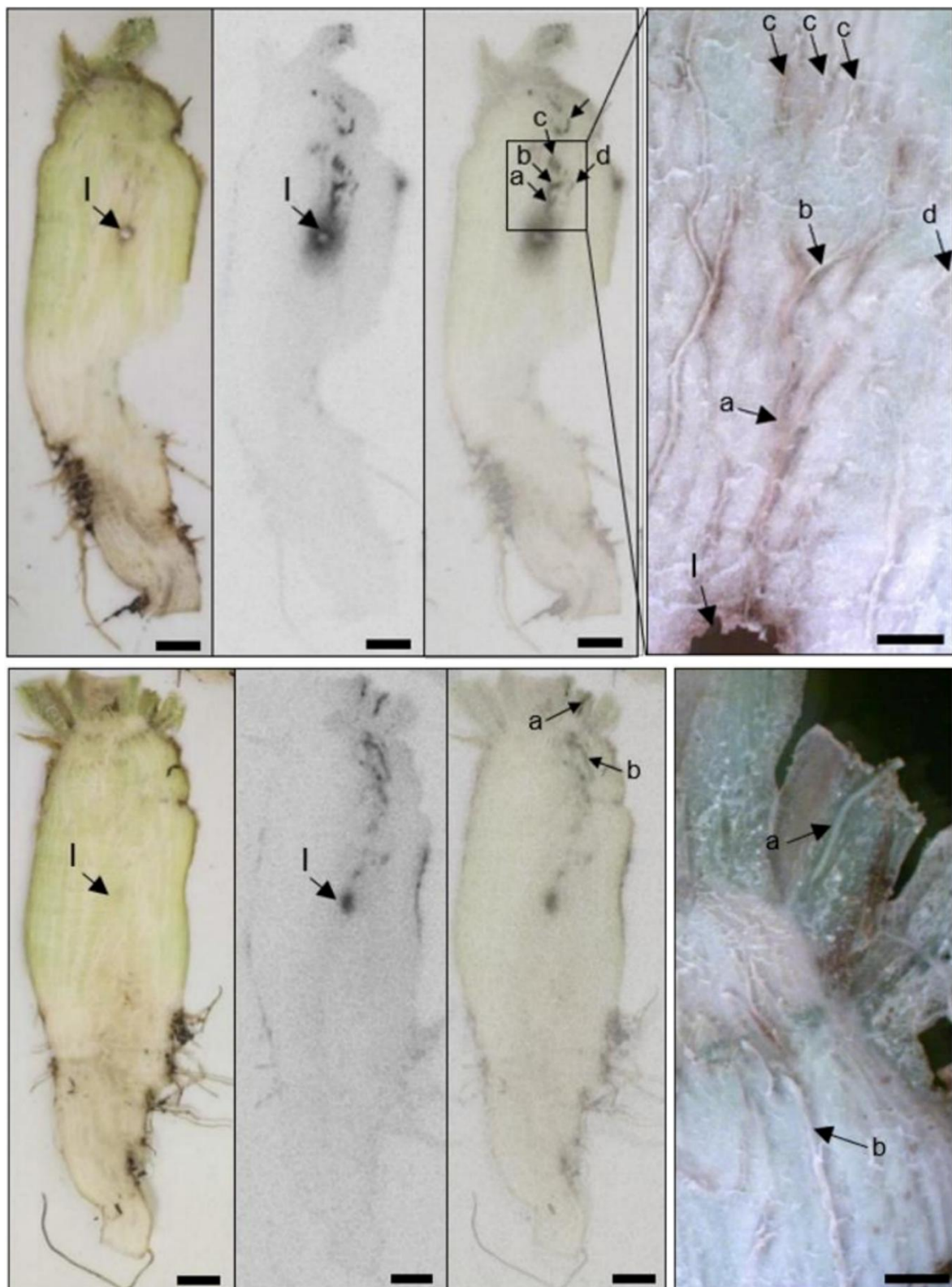
Ergänzende Abbildung 4. Phylogenie der SUS-Isoformen von *Beta vulgaris* und Proteinmengen der Bv-SUS-Isoformen in Pfahlwurzeln.

(A) Phylogenetischer Baum der Aminosäuresequenzen der Saccharosesynthase aus Zuckerrübe, Arabidopsis und Kartoffel. (B, C) Proteinmengen von BvSUS1 und BvSUS2 (LFQ-Werte) in der löslichen Proteinfraktion der Pfahlwurzeln von drei verschiedenen Genotypen die entweder bei 20 °C kultiviert oder nach einer Kultivierung bei 20 °C für zwei Wochen auf 4 °C überführt wurden.



Ergänzende Abbildung 5. Phosphorylierte Metabolite in Sprossen und Pfahlwurzeln von Zuckerrübenpflanzen.

(A) Schematische Darstellung des Saccharosestoffwechsels. (B-F) Konzentrationen phosphorylierter Metabolite im Spross und Wurzel von drei verschiedenen, die acht Wochen lang bei 20 °C kultiviert und anschließend entweder für zwei weitere Wochen bei 20 °C gehalten oder auf 4 °C überführt wurden. SPS, Saccharose-Phosphat-Synthase; SPP, Saccharose-Phosphat-Phosphatase; SUS, Saccharose-Synthase; G-6-P, Glucose-6-Phosphat; F-6-P, Fructose-6-Phosphat; UDP-Glc, UDP-Glucose; S-6-P, Saccharose-6-Phosphat.



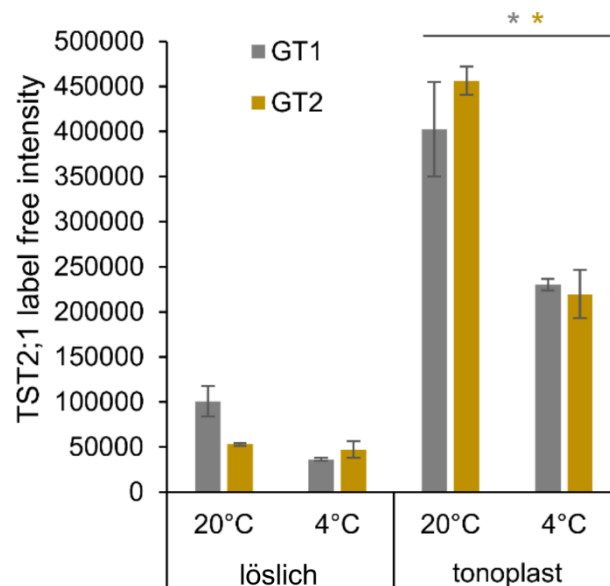
Ergänzende Abbildung 6. Aufnahme und Verteilung von Radioaktivität in Pfahlwurzelsgewebe unter Kältebedingungen.

Von links nach rechts: Fotografische Aufnahme, Phosphorbildgebung, Überlagerung aus Fotografie und Phosphorbildgebung, Vergrößerung relevanter Gewebsregionen. Pfeilspitzen markieren radioaktive Bereiche. l = Injektionsstelle; a, b, c, d = radioaktive Spots, die im angrenzenden Panel vergrößert dargestellt sind. Maßstab: 5 mm für Gesamtwurzelaufnahmen, 0,5 mm für Vergrößerungen (rechte Panels).



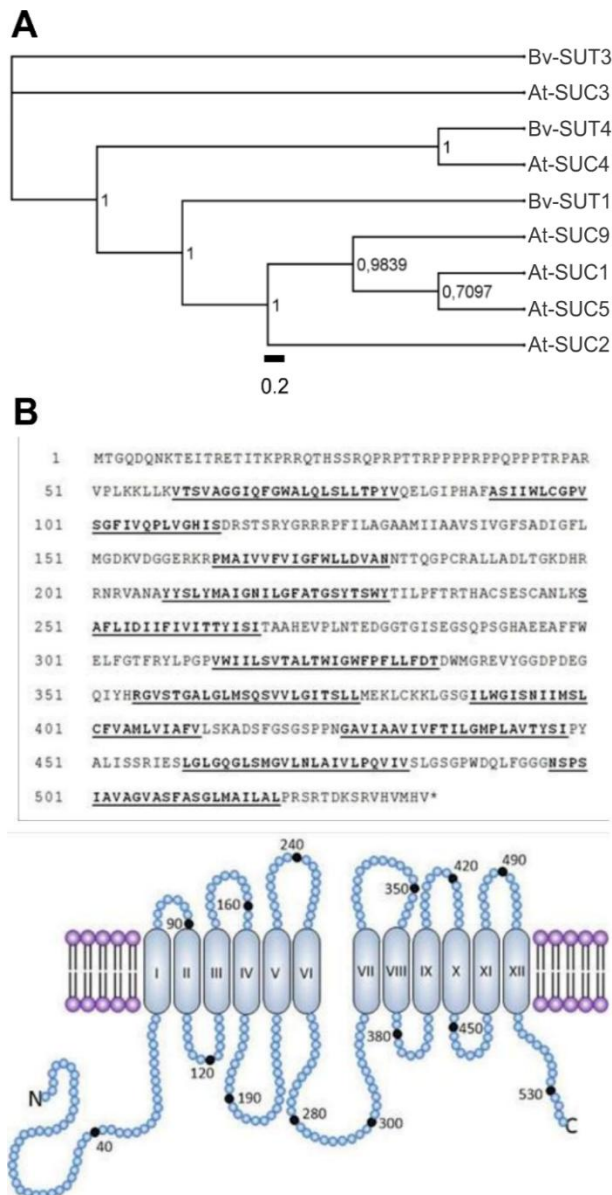
Ergänzende Abbildung 7. Aufnahme und Verteilung radioaktiver Markierung in Pfahlwurzelgewebe.

Von links nach rechts: Fotografische Aufnahme, Phosphorbildgebung, Überlagerung aus Fotografie und Phosphorbildgebung. Pfeilspitzen markieren radioaktive Bereiche. I = Injektionsstelle. Maßstab: 5 mm.



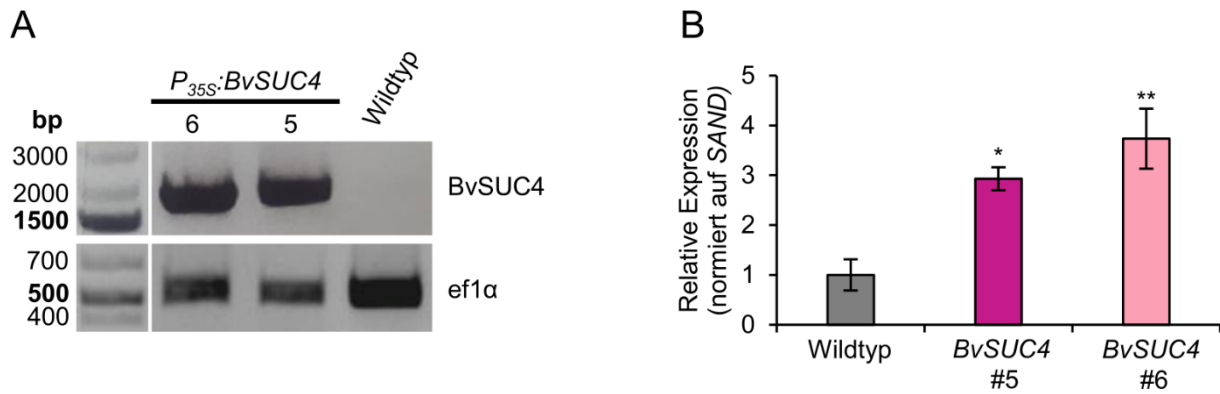
Ergänzende Abbildung 8. BvTST2;1-Proteinmengen.

Proteinmengen basierend auf MS-Werten, angegeben als LFQ-Werte. Werte sind Mittelwerte aus $n=6$ biologischen Replikaten pro Genotyp $\pm$ SE. Sternchen kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen 20 °C- und 4 °C-Behandlung gemäß t -Test (* $p<0,05$).



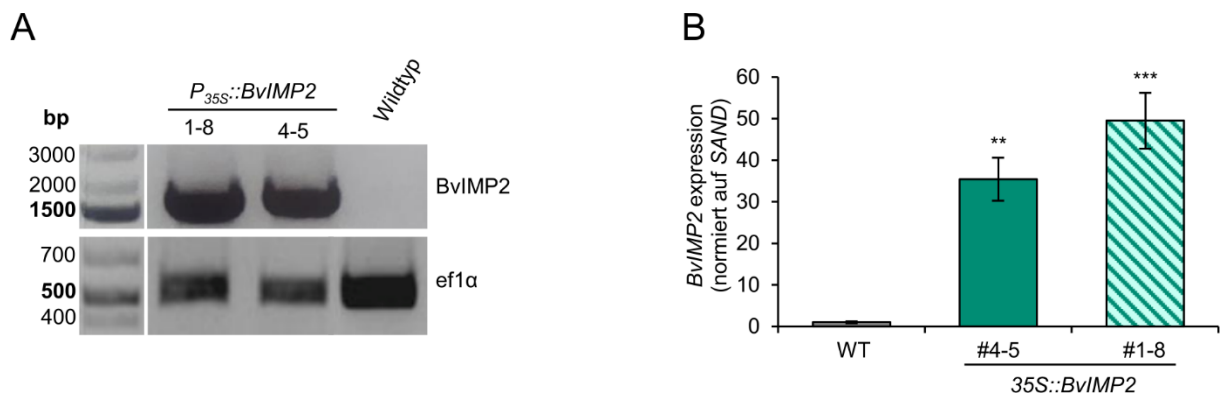
Ergänzende Abbildung 9. Phylogenie, Sequenz und vorhergesagte 2D-Proteinstruktur von Bv-SUT4.

(A) Unverwurzelter phylogenetischer Baum der Saccharosetransporter aus der SUT/SUC-Familie von *Beta vulgaris* und *Arabidopsis thaliana*. **(B)** Sequenz und schematische Darstellung des BvSUT4-Proteins. Das Protein besteht aus 535 Aminosäuren und enthält 12 Transmembrandomänen (unterstrichen). Der N-Terminus umfasst die ersten 58 Aminosäuren, der C-Terminus die letzten 14 Aminosäuren und liegt im Cytoplasma der Zelle. Es besitzt eine zentrale Schleife zwischen der sechsten und siebten Transmembrandomäne mit 35 Aminosäuren.



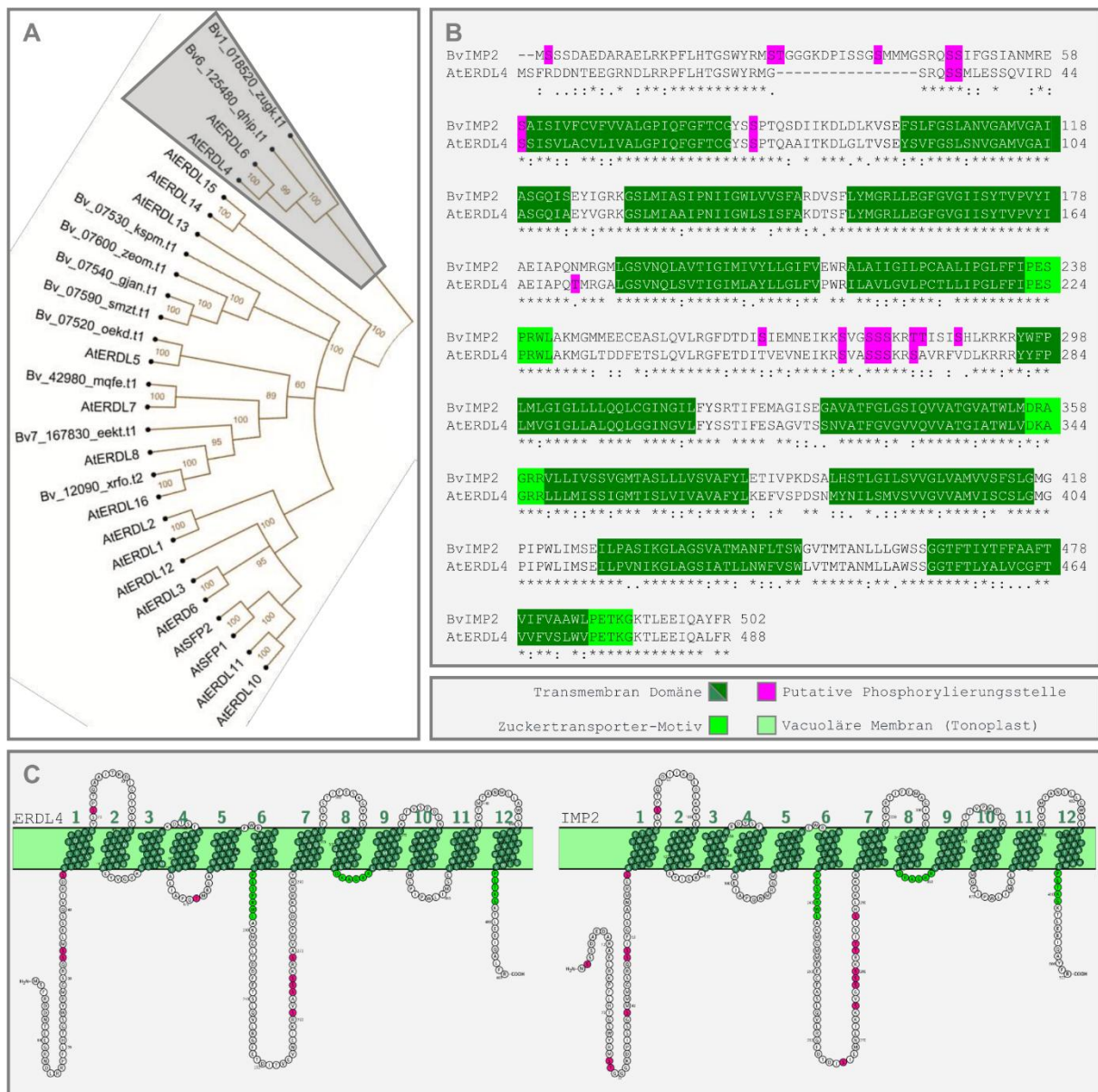
Ergänzende Abbildung 10. Erzeugung von *BvSUC4*-Überexpressoren im Wildtyp-Hintergrund unter Kontrolle eines konstitutiven Promotors.

(A) Semiquantitatives PCR-Ergebnis mit *BvSUC4*-spezifischen Banden in der oberen und *ef1α*-spezifischen Banden in der unteren Reihe. (B) Normierte relative Expression von *BvSUC4/AtSUC4* in Rosetten von Wildtyp (grau)- und *BvSUC4*-Überexpressionslinien (pink). Die Datenpunkte zeigen Mittelwerte von $n = 4$ Pflanzen $\pm$ SA. Sternchen zeigen statistisch signifikante Unterschiede zwischen den *BvSUC4*-Linien und dem Wildtyp an, die mit dem Students *t*-Test analysiert wurden (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$).



Ergänzende Abbildung 11. Erzeugung von *BvIMP2*-Überexpressoren im Wildtyp-Hintergrund unter Kontrolle eines konstitutiven Promotors.

(A) Semiquantitatives PCR-Ergebnis mit *BvIMP2*-spezifischen Banden in der oberen und *ef1α*-spezifischen Banden in der unteren Reihe. (B) Normierte *BvIMP2*-Expression von in Rosetten von Wildtyp (grau)- und *BvIMP2*-Überexpressionslinien (türkis). Die Datenpunkte zeigen Mittelwerte von $n = 4$ Pflanzen $\pm$ SA. Sternchen zeigen statistisch signifikante Unterschiede zwischen den *BvIMP2*-Linien und dem Wildtyp an, die mit dem Students *t*-Test analysiert wurden (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$).

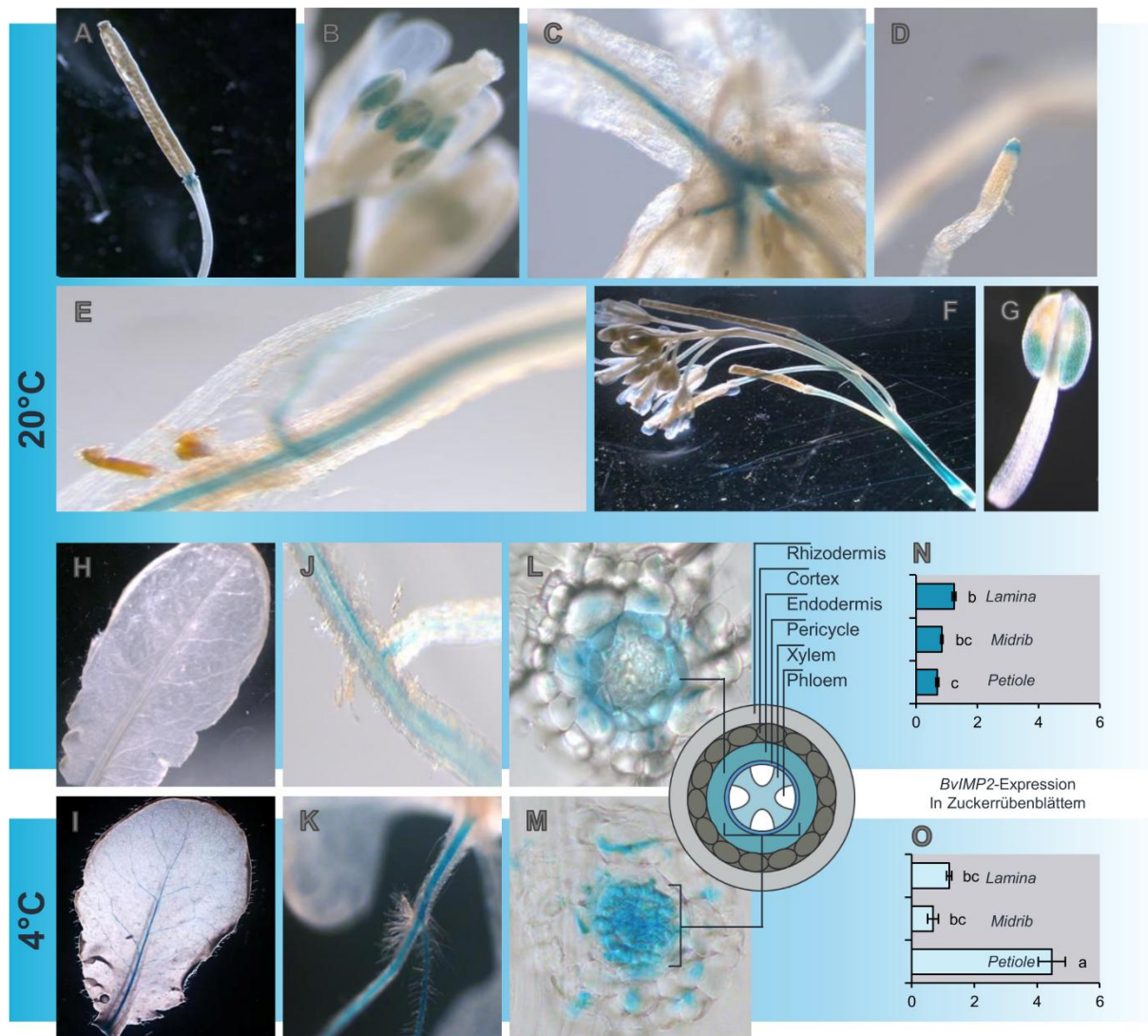


Ergänzende Abbildung 12. Phylogenie, Sequenz und vorhergesagte Sekundärstruktur von AtERDL4 und BvIMP2.

(A) Unverwurzelter phylogenetischer Baum der ERDL-Familie aus *Arabidopsis thaliana* und *Beta vulgaris*. Die Bayes'sche phylogenetische Analyse wurde mit MrBayes Version 3.2.6 (Ronquist *et al.*, 2012) durchgeführt. MrBayes wurde ausgeführt, indem zwei parallele Metropolis-gekoppelte Monte-Carlo-Markov-Ketten-Analysen mit vierundzwanzigtausend Generationen durchgeführt wurden. Die Standardabweichung der Split-Häufigkeiten lag unter 0,01. Der Baum wurde mit FigTree v.1.4.3 visualisiert.

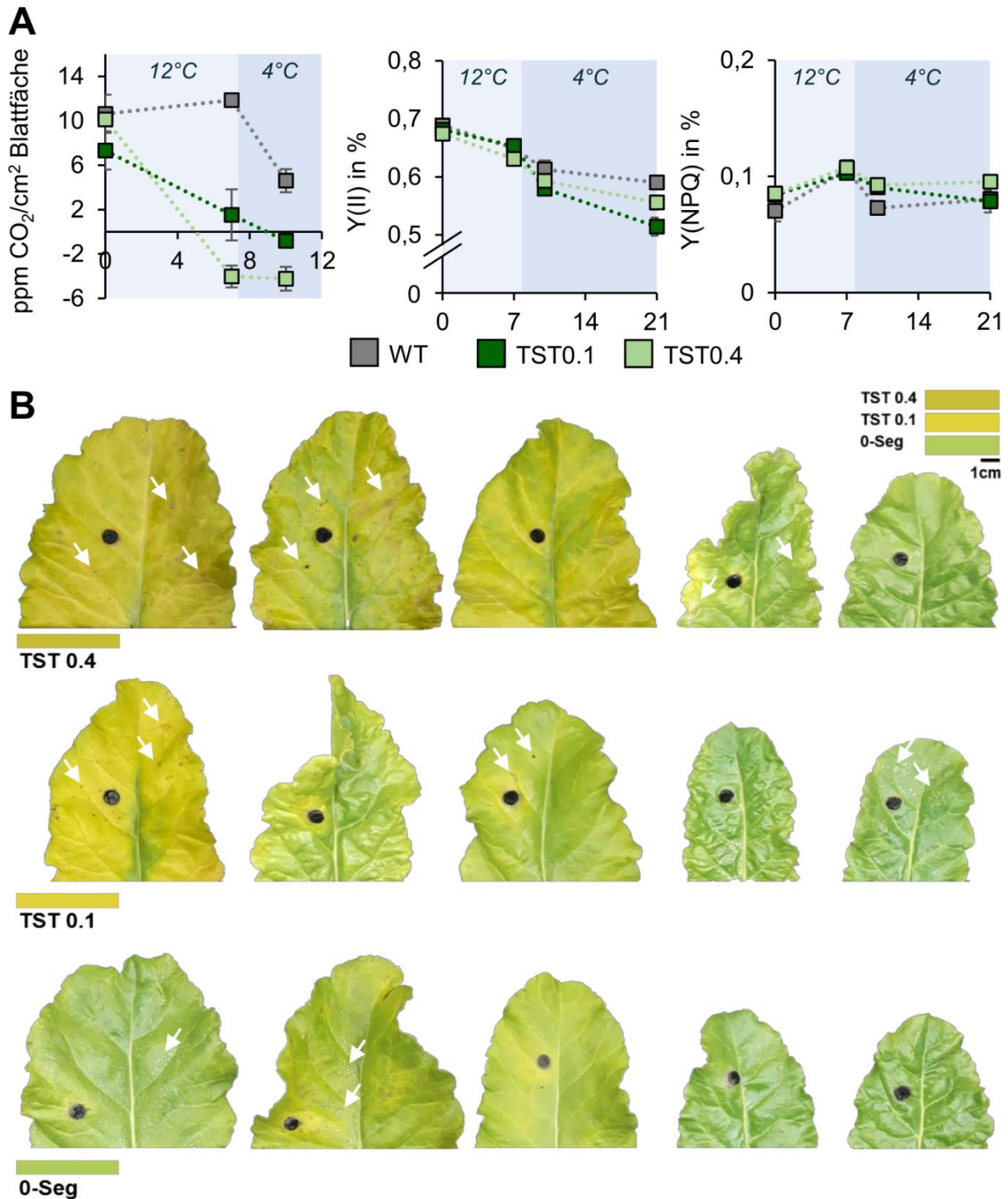
(B) Alignment der AtERDL4- und BvIMP2-Proteinsequenz, die 70 % Identität aufweist (BLASTP; <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Das AtERDL4-Protein ist mit 488 AS kürzer als das BvIMP2-Protein mit 502 AS, was hauptsächlich auf den 16 AS langen N-Terminus von BvIMP2 zurückzuführen ist. Beide Proteine bestehen aus 12 Transmembrandomänen, einem 16 AS langen C-Terminus und einer zentralen Schleife zwischen Transmembrandomäne 6 und 7 mit einer Länge von 59 AS.

(C) Schematische Darstellung der Sekundärstruktur von AtERDL4- (links) und BvIMP2-Proteinen (rechts), visualisiert mit dem Webtool Protter (<http://wlab.ethz.ch/protter/start/>). Die dunkelgrün gefärbten Transmembrandomänen wurden mit dem Tool TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) identifiziert. Hochkonservierte Motive, die auf eine Zuckertransportaktivität des jeweiligen Proteins hinweisen, sind neongrün eingefärbt (Henderson, 1991). Mögliche Phosphorylierungsstellen, die mit dem Webtool NetPhos 3.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) mit einer Punktzahl von mehr als 0,7 identifiziert wurden, sind rosa eingefärbt.



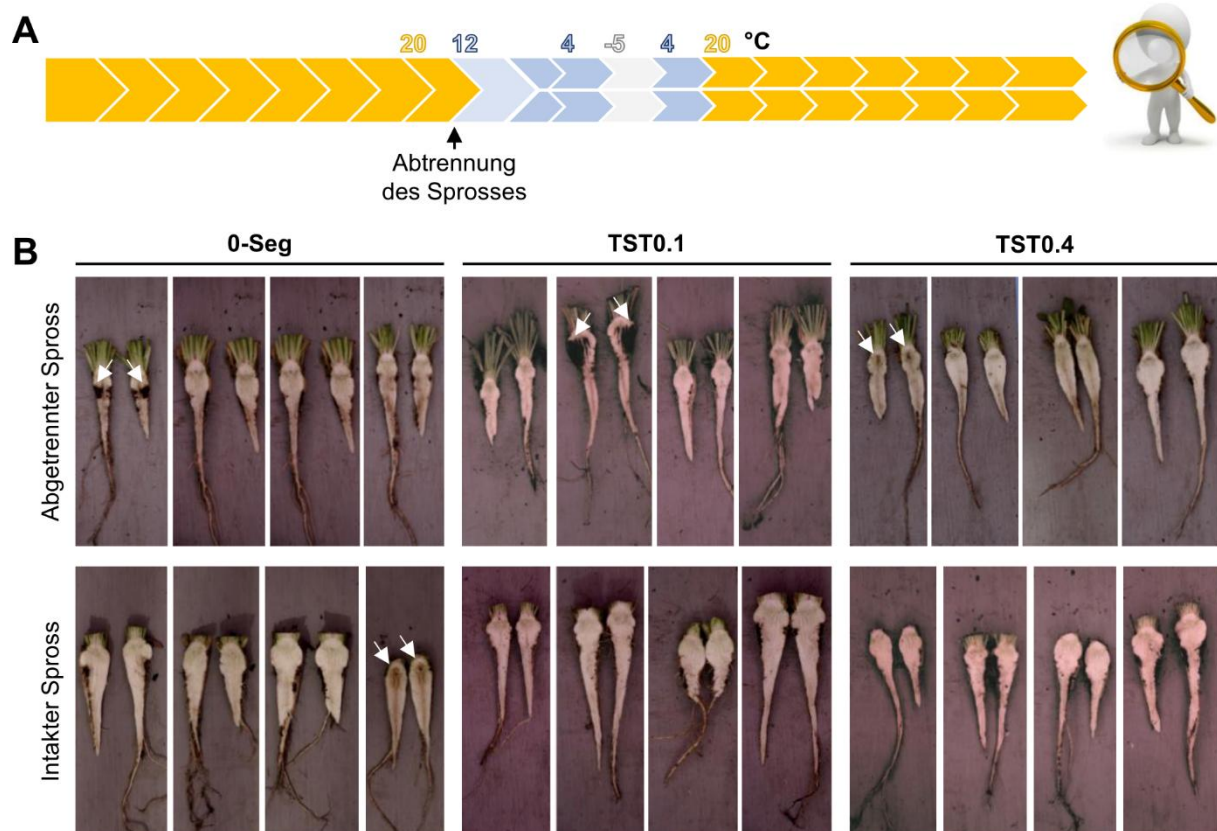
Ergänzende Abbildung 13. Gewebs- und temperaturspezifische Lokalisierung.

Die *AtERDL4Pro::GUS*-Fusion wird hauptsächlich im Gefäßsystem, in der Wurzelspitze und in den Staubbeuteln exprimiert. Die Expression im Gefäßsystem wird verstärkt, und die endodermale Expression ändert sich als Reaktion auf eine Kältebehandlung zu einer vaskulären Expression in Wurzeln. Die *BvIMP2*-Expression ändert sich bei Kälte vom Mesophyll zum Gefäßsystem. **A** Schote. **B** Geöffnete Blüte. **C** Blütenstiel. **D** Wurzelspitze. **E** Zentraler Zylinder der Wurzel. **F** Stängel mit Blüte und Knospen. **G** Staubblatt. **H** Blatt. **I** Blatt bei 4 °C. **J** Wurzel. **K** Wurzel bei 4 °C. **L** Wurzelquerschnitt. **M** Wurzelquerschnitt bei 4 °C. **N** *BvIMP2*-Expression in Zuckerrübenblättern. **O** *BvIMP2*-Expression in Zuckerrübenblättern bei 4 °C. Die Datenpunkte zeigen Mittelwerte von $n = 3$ bis 6 Pflanzen $\pm$ SA. Signifikante Unterschiede wurden mittels zweifaktoriellem ANOVA mit anschließendem post-hoc Tukey-Test berechnet ($p \leq 0,001$). Mittelwerte, die keinen Buchstaben gemeinsam haben, sind signifikant unterschiedlich.



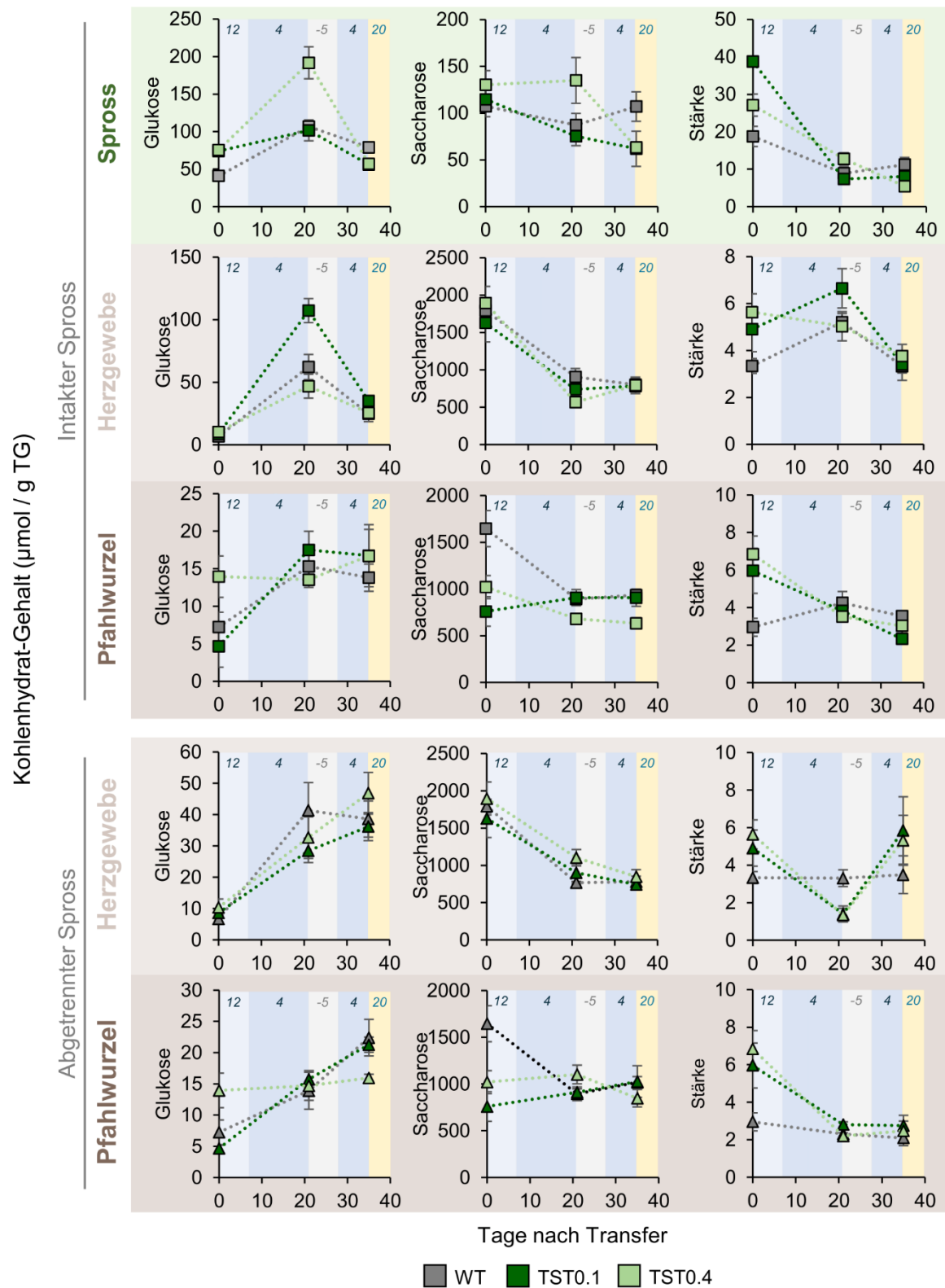
Ergänzende Abbildung 14. Auswirkung der Überexpression von *AtTST1* auf den Spross.

(A) CO₂-Assimilationsrate, Photosystem II-Effizienz [Y(II)] und Non-photochemical quenching [Y(NPQ)] von Hybrid- (grün) und den korrespondierenden Wildtyp-Zuckerrüben (grau) nach Transfer der Pflanzen auf 4 °C nach einwöchiger Akklimatisierung auf 12 °C. (B) Repräsentative Aufnahme von mit *Cercospora beticola* behandelten Blättern. Pfeilspitzen zeigen auf Läsionen.



Ergänzende Abbildung 15. Auswirkung der Dekapitation auf das Wurzelgewebe.

(A) Schema der Zuckerrüben-Anzucht. **(B)** Repräsentative Aufnahme der Pfahlwurzel von Zuckerrüben, welche vom Spross getrennt wurden (oben) sowie von unbehandelte Pflanzen (unten). Unabhängig vom Genotyp zeigen die Rüben ohne Spross öfter Schäden im Herzgewebe als bei Kontrollpflanzen. Pfeilspitzen zeigen auf beschädigtes Gewebe.



Ergänzende Abbildung 16. Biomasse und Zuckergehalt kältebehandelter Zuckerrübenblätter und Pfahlwurzeln.

(A) bis (C) Verhalten von Blättern und Pfahlwurzeln drei verschiedener Zuckerrübengenotypen auf kalte Temperaturen. Die Aufzeichnung der Biomasse und der Zuckerakkumulation erfolgte zeitgleich mit der 4 °C-Behandlung. Frischgewicht (FG) (A), Trockengewicht (TG) (B), Wassergehalt ($\text{H}_2\text{O} / \text{g TG}$) (C) von Blättern und Wurzeln.

(D) bis (G) Gehalt an Glukose (D), Fruktose (E), Saccharose (F) und Stärke (G) in Blättern bzw. Pfahlwurzeln im Verlauf der Kälteperiode (4 °C). Die Datenpunkte zeigen Mittelwerte von $n = 6$ bis 10 Pflanzen $\pm$ SA. Signifikante Änderungen im Vergleich zur Kontrollbedingung (erster Datenpunkt) wurden mittels einfaktoriellem ANOVA mit post-hoc Tukey Test berechnet ($p < 0,05$).

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Cristina Schmale Rodrigues geb. Martins Rodrigues

Werdegang

- 11/2020 – heute **Wissenschaftliche Referentin und Projektmanagerin**
eScience, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg
- 06/2017 – 11/2020 **Wissenschaftliche Mitarbeiterin und Doktorandin**
Abteilung Pflanzenphysiologie, TU Kaiserslautern
Prof. Dr. Ekkehard Neuhaus
in Kooperation mit KWS SAAT SE Co. KGaA | Südzucker AG
FAU Erlangen-Nürnberg | Universität Würzburg
- 04/2019 – 11/2020 **Studentische Sprecherin des Graduiertenkollegs**
International Research Training Group 1830
- 10/2019 **Praktikantin**
Eurofins Agrosience Services EcoChem GmbH
- 10/2015 – 05/2017 **Master in Microbial and Plant Biotechnology**
TU Kaiserslautern

Abschlussarbeit, Abteilung Pflanzenphysiologie, Prof. Dr. Ekkehard Neuhaus
Physiological and biochemical analyses of sugar transporter-dependent cold response of *Arabidopsis thaliana*

Abschluss: Master of Science (1,4)
 - Studentisches Mitglied des Fachbereichsrats
 - Studentisches Mitglied des Prüfungsausschusses
 - Studentisches Mitglied in einer W3-Berufungskommission
- 10/2015 – 11/2015 **Wissenschaftliche Hilfskraft**
Abteilung Pflanzenphysiologie, TU Kaiserslautern
- 09/2015 – 10/2015 **Wissenschaftliche Hilfskraft**
Dekanat der Biologie, TU Kaiserslautern

04/2012 – 03/2015 **Bachelor in Biowissenschaften**

TU Kaiserslautern

Abschlussarbeit, Abteilung Pflanzenphysiologie, Prof. Dr. Ekkehard Neuhaus

Charakterisierung molekularer Prozesse während der Salzstress-Antwort in

Arabidopsis thaliana

Abschluss: Bachelor of Science (1,7)

- Studentisches Mitglied des Fachbereichsrats
- Mitglied des Fachschaftsrats

09/2015 – 10/2015 **Abitur**

Gymnasium zu St. Katharinen Oppenheim

Relevante Publikationen

- Duscha, K., Martins Rodrigues, C., Müller, M., Wartenberg, R., Fliegel, L., Deitmer, J. W., Jung, M., Zimmermann, R., Neuhaus, H. E. (2020). 14-3-3 Proteins and Other Candidates form Protein-Protein Interactions with the Cytosolic C-terminal End of SOS1 Affecting Its Transport Activity. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(9). <https://doi.org/10.3390/ijms21093334>
- Garth, C., Lukasczyk, J., Mühlhaus, T., Venn, B., Krüger, J., Glogowski, K., Martins Rodrigues, C., Suchodoletz, D. von (2022). Immutable yet evolving: ARCs for permanent sharing in the research data-time continuum. *E-Science-Tage 2021*. Advance online publication. <https://doi.org/10.11588/HEIBOOKS.979.C13751>
- Keller, I., Martins Rodrigues, C., Neuhaus, H. E., Pommerrenig, B. (2021). Improved resource allocation and stabilization of yield under abiotic stress. *Journal of Plant Physiology*, 257, 153336. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2020.153336>
- Keller, I., Müdsam, C., Martins Rodrigues, C., Kischka, D., Zierer, W., Sonnewald, U., Harms, K., Czarnecki, O., Fiedler-Wiechers, K., Koch, W., Neuhaus, H. E., Ludewig, F., Pommerrenig, B. (2021). Cold-Triggered Induction of ROS- and Raffinose Metabolism in Freezing-Sensitive Taproot Tissue of Sugar Beet. *Frontiers in Plant Science*, 12, 715767. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.715767>
- Martins Rodrigues, C., Müdsam, C., Keller, I., Zierer, W., Czarnecki, O., Corral, J. M., Reinhardt, F., Nieberl, P., Fiedler-Wiechers, K., Sommer, F., Schroda, M., Mühlhaus, T., Harms, K., Flügge, U.-I., Sonnewald, U., Koch, W., Ludewig, F., Neuhaus, H. E., Pommerrenig, B. (2020). Vernalization Alters Sink and Source Identities and Reverses Phloem Translocation from Taproots to Shoots in Sugar Beet. *The Plant Cell*, 32(10), 3206–3223. <https://doi.org/10.1105/tpc.20.00072>
- Martins Rodrigues, C., Suchodoletz, D. von, Mühlhaus, T., Krüger, J., Usadel, B. (2021). DataPLANT – Ein NFDI-Konsortium der Pflanzen-Grundlagenforschung. Advance online publication. <https://doi.org/10.17192/bfdm.2021.2.8335>
- Mühlhaus, T., Brilhaus, D., Tschöpe, M., Maus, O., Grüning, B., Garth, C., Martins Rodrigues, C., Suchodoletz, D. von (2022). DataPLANT – Tools and Services to structure the Data Jungle for fundamental plant researchers. *E-Science-Tage 2021*. Advance online publication. <https://doi.org/10.11588/heibooks.979.c13724>
- Patzke, K., Prananingrum, P., Klemens, P. A. W., Trentmann, O., Martins Rodrigues, C., Keller, I., Fernie, A. R., Geigenberger, P., Bölter, B., Lehmann, M., Schmitz-Esser, S., Pommerrenig, B., Haferkamp, I., Neuhaus, H. E. (2019). The Plastidic Sugar Transporter pSuT Influences Flowering and Affects Cold Responses. *Plant Physiology*, 179(2), 569–587. <https://doi.org/10.1104/pp.18.01036>
- Suchodoletz, D. von, Mühlhaus, T., Brilhaus, D., Jabeen, H., Usadel, B., Krüger, J., Gauza, H., Martins Rodrigues, C. (2022). Data Stewards as ambassadors between the NFDI and the community. *E-Science-Tage 2021*. Advance online publication. <https://doi.org/10.11588/heibooks.979.c13750>
- Vu, D. P., Martins Rodrigues, C., Jung, B., Meissner, G., Klemens, P. A. W., Holtgräwe, D., Fürtauer, L., Nägele, T., Nieberl, P., Pommerrenig, B.,

Neuhaus, H. E. (2020). Vacuolar sucrose homeostasis is critical for plant development, seed properties, and night-time survival in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, 71(16), 4930–4943. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa205>

Weil, H. L., Schneider, K., Tschöpe, M., Bauer, J., Maus, O., Frey, K., Brilhaus, D., Martins Rodrigues, C., Doniparthi, G., Wetzels, F., Lukasczyk, J., Kranz, A., Grüning, B., Zimmer, D., Deßloch, S., Suchodoletz, D. von, Usadel, B., Garth, C., Mühlhaus, T. (2023). Plantdatahub: A collaborative platform for continuous FAIR data sharing in plant research. *The Plant Journal*, 116(4), 974–988. <https://doi.org/10.1111/tpj.16474>

Auszeichnungen

02/2020	Reinhold von Sengbusch Preis Vortrag - MBP2020 in Dabringhausen
03/2019	Auszeichnung für exzellente Wissenschaftskommunikation <i>verliehen von der Gemeinschaft zur Förderung von Pflanzeninnovation e.V. (GFPI)</i> Elevator Pitch - PLANT2030 Statusseminar in Potsdam
03/2016 – 05/2017	Stipendium Friedrich-Ebert-Stiftung

Danksagung

In erster Linie möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. H. Ekkehard Neuhaus für die Aufnahme in die Arbeitsgruppe und in das BETAHIEMIS-Konsortium, den Einblick in die wissenschaftliche Arbeit und selbstverständlich für das Erstgutachten meiner Arbeit bedanken. Besonders dankbar bin ich ihm auch für die persönlichen Gespräche und Denkanstöße, sein stetiges Vertrauen in meine Arbeit sowie seine motivierenden Worte, die maßgeblich dazu beigetragen haben, dass ich diese Arbeit letztlich fertiggestellt habe. Seine bestärkende Art war für mich eine große Hilfe – fachlich wie menschlich.

Zudem gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Matthias Hahn für seine Hilfsbereitschaft bei Studienangelegenheiten und für die Übernahme des Zweitgutachtens meiner Arbeit sowie Herrn Prof. Dr. Michael Schroda für die Übernahme des Vorsitzes der Promotionskommission – aber auch dafür, mir die Friedrich-Ebert-Stiftung näher gebracht zu haben.

Ein ganz besonderer Dank gilt Benjamin Pommerrenig für seine offene, freundliche und sympathische Art, welche mir den denkbar angenehmsten Laboralltag ermöglicht hat. Die persönliche und vor allem auch fachliche Betreuung war hervorragend, und sein Optimismus essenziell, um auch bei vermeintlich unspektakulären Ergebnissen am Ball zu bleiben.

Vielen Dank auch dir, liebe Izzy – oder mittlerweile Frau Dr. Isabel(I) Keller – für all die wunderbaren Gespräche, das Rübenausbuddeln und Vakuolenisolieren, den Teamgeist beim Drachenbootfahren, das gemeinsame Pitchen unserer Poster und vieles mehr. Generell möchte ich dem gesamten BETAHIEMIS-Team für die großartige Zusammenarbeit und herausragende Wissenschaft, aber auch für die geselligen Projekttreffen danken. Ein besonderer Dank geht an Dr. Christina Müdsam dafür, einfach mal Quatsch reden und machen zu dürfen. Es war mir eine Ehre, Teil eines so außergewöhnlichen Teams gewesen zu sein.

Vielen Dank auch an alle Mitarbeitenden der AG Neuhaus für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die große Hilfsbereitschaft bei allen Fragen, sowie für die leckeren Kuchen zu jeglichen Festivitäten. Ganz herzlich danke ich Dr. Torsten Möhlmann für seine stete Bereitschaft, die Lösung von Problemen gemeinsam anzugehen. Insbesondere gilt der Dank auch Ruth für Antworten auf alltägliche und vor allem experimentelle Fragen sowie Ute, ohne deren Anwesenheit die Laborschränke nur halb so voll wären. Auch ohne Regina, Maiko und Verena wäre ich mit der Bedienung des einen oder anderen Geräts völlig aufgeschmissen gewesen – deshalb auch an dieser Stelle in großes Dankeschön an euch. Ebenso danken für zahlreiche Messungen nicht nur während meiner Promotionszeit möchte ich Wolfgang und Frank.

Ein ganz besonderer Dank gilt dem gesamten Team aus Labor 1005, das eine unvergleichlich gute Arbeitsatmosphäre geschaffen hat. Sherry, du hast unser Büro mit deiner witzigen Ader sehr bereichert – und auch unsere Gaumen mit deinen leckeren Rezepten gekitzelt. Vielen Dank auch an Annalisa, Vanessa und Leo dafür, dass sogar ich – man mag es wirklich nicht glauben – das eine oder andere Mal Spaß am Joggen hatte.

Ein großer Dank geht auch an Tim Seibel für die helfende Hand während zahlreicher Versuche sowie an Andi, Michael, Mackenzie und Fidele dafür, dass sie mir im Rahmen ihrer Abschlussarbeiten und Praktika ihr Vertrauen geschenkt haben. Eure Projekte haben nicht nur euch weitergebracht, sondern auch mir wichtige Impulse für meine Entwicklung als Wissenschaftlerin und Betreuerin gegeben.

Weiterhin möchte ich mich bei Dr. Gabriele Amoroso bedanken, die mich im Rahmen des IRTG1830 tatkräftig unterstützt, mir die Welt der Koordination eröffnet und mich im Rahmen meiner studentischen Sprecherschaft zum Üben in diesem Bereich ermutigt hat.

Herzlich bedanken möchte ich mich nicht zuletzt bei meinen Freunden, welche mich wenn angebracht auch einmal von der Wissenschaft ferngehalten haben. Insbesondere Nedi, Anna, Justus, Vinny und Claudia haben nicht nur die ein oder andere Wanderung durch den Pfälzer Wald, sondern die gesamte Promotionszeit versüßt.

Von ganzem Herzen danke ich meiner Familie für die jahrelange Unterstützung, die mir oft erst das nötige Durchhaltevermögen verliehen hat. Mein tiefster Dank gilt meiner kleinen Familie – Dennis und Joel – die mein Leben nicht nur unermesslich bereichern, sondern auch wunderbar durcheinanderwirbeln. Danke, dass ihr immer hinter mir steht, selbst wenn mein Kopf manchmal noch bei Genen und Zuckertransportern hängt – und dass ihr mein persönliches Gleichgewicht zwischen Wissenschaft und Wahnsinn seid.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Cristina Schmale Rodrigues, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und ohne unerlaubte Hilfe verfasst und keine anderen Quellen und Hilfsmittel als die angegebenen verwendet habe.

Ich versichere, dass ich weder an der Rheinland-Pfälzischen Technischen Universität noch anderweitig versucht habe, eine Dissertation einzureichen oder mich einer Doktorprüfung zu unterziehen.

Kaiserslautern, den 08.05.2025

Cristina Schmale Rodrigues

Darlegung des Eigenanteil

Cristina Schmale Rodrigues

Chilling Lektionen: So lernen Zuckerrüben, mit der Kälte umzugehen

Die in Kapitel 3.1 dargestellten Ergebnisse entstanden in Zusammenarbeit der Teilprojekte A (Prof. Dr. H. Ekkehard Neuhaus; Technische Universität Kaiserslautern, heute Rheinland-Pfälzische Technische Universität Kaiserslautern-Landau) und B (Prof. Dr. Uwe Sonnewald; Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg) sowie der industriellen Partner KWS SAAT SE (Herr Dr. Wolfgang Koch) und Südzucker AG (Herr Dr. Karsten Harms) im Rahmen des durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) geförderten Projekts BETAHIEMIS (Förderkennzeichen 031B0185).

Modifizierte Abbildungen und Texte stammen aus folgender Publikation:

Martins Rodrigues, C., Müdsam, C., Keller, I., Zierer, W., Czarnecki, O., Corral, J. M., Reinhardt, F., Nieberl, P., Fiedler-Wiechers, K., Sommer, F., Schroda, M., Mühlhaus, T., Harms, K., Flügge, U.-I., Sonnewald, U., Koch, W., Ludewig, F., Neuhaus, H. E., Pommerrenig, B. (2020). Vernalization Alters Sink and Source Identities and Reverses Phloem Translocation from Taproots to Shoots in Sugar Beet. *The Plant Cell*, 32(10), 3206–3223. <https://doi.org/10.1105/tpc.20.00072>

Dabei entwickelten H.E.N., F.L., W.K., K.H., U.S., U.-I.F. und B.P. das Forschungskonzept; C.M.R., C.M., I.K., W.Z., F.R., P.N., K.F.-W. und B.P. führten die Forschung durch; O.C., J.M.C., T.M., O.C., J.M.C., T.M., F.S. und M.S. steuerten neue analytische, rechnerische und andere Hilfsmittel bei; C.M.R., C.M., I.K., F.L. und B.P. analysierten Daten und B.P., C.M., C.M.R. und H.E.N. haben das Manuskript (s.o.) verfasst.

Die vorliegende Einschätzung über die erbrachte Leistung von Dritten wurde mit den genannten Personen einvernehmlich abgestimmt.

Cristina Schmale Rodrigues

Prof. Dr. H. Ekkehard Neuhaus

Darlegung aller benutzten Hilfsmittel und Hilfestellungen

Cristina Schmale Rodrigues

Chilling Lektionen: So lernen Zuckerrüben, mit der Kälte umzugehen

Zusätzlich zu den bereits im Kapitel 2 (Material und Methoden) aufgeführten Hilfsmitteln wurde zur Erstellung dieser Arbeit MS Office (Microsoft Corporation, 2023; Redmond, WA, USA) verwendet. Das Literaturverzeichnis sowie die Literaturverweise wurden mithilfe der Literaturverwaltungssoftware Citavi (Swiss Academic Software GmbH, 2024; Wädenswil, Schweiz) erstellt. Zur sprachlichen Optimierung einzelner Textabschnitte wurde das Übersetzungsprogramm DeepL (DeepL SE, 2024; Köln, Deutschland) eingesetzt. Darüber hinaus kam ChatGPT (OpenAI, 2024; San Francisco, CA, USA) zum Einsatz, um sicherzustellen, dass die inhaltliche Essenz der jeweiligen Passagen klar und verständlich vermittelt wird.

Cristina Schmale Rodrigues