

# Untersuchung der physiologischen Funktion des Saccharosetransporters SUT4 in ausgewählten Solanaceen

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Diplom-Biotechnologin Izabela Anna Chincinska geb. Domańska

geb. am 08.04.1979 in Złotoryja (Polen)

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin: Prof. Dr. Dr. h.c. Christoph Marksches  
Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I: Prof. Dr. Lutz-Helmut Schön

**Gutachter: 1. Prof. Dr. Thomas Buckhout**

**2. PD Dr. Philipp Franken**

**3. PD Dr. Christina Kühn**

Tag der mündlichen Prüfung: 8. Juli 2009

## I. Zusammenfassung

Saccharosetransporter sind integrale Membranproteine, die von der SUT-Genfamilie kodiert werden. In Solanaceen wurden vier verschiedene Saccharosetransporter mit Vertretern in drei Subfamilien identifiziert: in der SUT1-, der SUT2-, und der SUT4-Unterfamilie. Bislang am besten wurde die Funktion und Bedeutung des SUT1 charakterisiert. SUT1 ist für den Transport von Saccharose, die bei Solanaceen die Haupttransportform der Photoassimilate darstellt, essentiell. Die Funktion von SUT4 wurde bisher nur fragmentarisch geklärt.

Für die Aufklärung der physiologischen Funktion und Bedeutung des SUT4 in Solanaceen wurde die Analyse der SUT4-Expression in Wildtyp Kartoffeln (*Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum*) der Varietät Désirée vorgenommen. Die Expressionsanalyse erfolgte über eine Quantifizierung des Transkriptgehalts mittels real time PCR. Die Untersuchungen weisen auf eine Organ- und Entwicklungs-spezifische SUT4-Expression. Die SUT4-Expression, sowie die Expression der beiden anderen Saccharosetransporter, SUT2 und SUT1 zeigten eine Tagesrhythmik.

Mit Hilfe der RNA Interferenz-Technik wurden transgene Pflanzen mit einer reduzierten SUT4-Expression hergestellt. Drei Solanaceen-Arten wurden transformiert: *Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum* der Varietät Désirée, *Solanum tuberosum* ssp. *andigena* und *Solanum lycopersicon* (Tomate). StSUT4-RNAi Kartoffeln zeigten schwerwiegende phänotypische Veränderungen: reduzierte Stängel elongation, frühere Blühinduktion und frühzeitige und gesteigerte Knollenbildung unter nicht-induktiven Langtagbedingungen. StSUT4-RNAi Kartoffel zeigten auch Veränderungen des Kohlenhydratprofils in den Source- und Sink-Organen, sowie in den Phloemexudaten, welches Konsequenzen für das Blühverhalten und die Knolleninduktion der Pflanzen haben kann. Eine vermehrte Zuckertranslokation von Source-zu-Sink wurde postuliert.

Bestimmte Aspekte des StSUT4-RNAi Phänotyps wurden früher bereits für Pflanzen mit Veränderungen der Gibberellin-Antwort, sowie für Pflanzen mit deregulierter photoperiodischen Signaltransduktion beschrieben. In den StSUT4-RNAi Blättern wurden verringerte Transkriptmengen eines GA-Biosynthese-Enzyms (StGA20ox1) festgestellt. Der Versuch der Komplementation des StSUT4-RNAi Phänotyps durch GA3-Behandlung waren jedoch nicht erfolgreich. Die StSUT4-RNAi Pflanzen zeigen außerdem eine erhöhte PhyB-Transkriptakkumulation. Durch eine Änderung der PhyB-Aktivität liesse sich die in den StSUT4-RNAi Pflanzen beobachtete Insensitivität gegenüber Tageslänge und Infrarotlicht-Anteil (bei Beschattung) erklären. Es wurde gezeigt, dass es unter Beschattung zu einer erhöhten SUT4-mRNA-Akkumulation kommt. In den StSUT4-RNAi Pflanzen wurden Veränderungen der Expression photoperiodisch regulierter Gene beobachtet, was für die beschleunigte Blühinduktion und die frühere Knollenbildung vermutlich ursächlich sein könnte.

Bei den transgenen StSUT4-RNAi Kartoffeln scheinen also mehrere genetische Signalübertragungswege dereguliert zu sein, was auf eine Rolle des SUT4 als ein Integrator der pflanzlichen Antwort auf Licht, Hormone und Zucker hinweisen könnte.

Schlagnworte: Saccharosetransporter, *Solanum tuberosum*, Blühinduktion, Knollenbildung, Photoperiod, Gibberellin, Saccharose als Signalmolekül.

## II. Abstract

Sucrose transporters are integral membrane proteins, which are encoded by the SUT gene family. In Solanaceae four different sucrose transporter genes have been identified, belonging to three subfamilies: the SUT1, SUT2, and SUT4 subfamily. The function of the sucrose transporter SUT1 is well characterized. SUT1 is essential for the long distance transport of sucrose, which represents the main transport form of photoassimilates in Solanaceae. So far, the function of the sucrose transporters belonging to the SUT4 subfamily is only poorly understood.

For the investigation of the physiological function of SUT4 in Solanaceous plants, the expression of SUT4 was analyzed in wild type of potato, *Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum* var. *Désirée*. The detailed expression studies were performed by quantitative analysis of SUT4 transcripts via real time PCR. The SUT4 expression was shown to be sink and development specific. StSUT4 expression, as well as the expression of the two other sucrose transporters from potato, StSUT1 and StSUT2 follow a diurnal rhythm.

An RNA interference approach was used for the generation of transgenic plants with reduced SUT4 expression. Three Solanaceous species have been transformed with a StSUT4 RNAi construct: *Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum* *Désirée*, *Solanum tuberosum* ssp. *andigena* and *Solanum lycopersicon* (tomato). The transgenic potato plants show a reduced internode elongation, early flowering, early tuberization and higher tuber yield under long-day conditions. Changes of the carbohydrate content in source as well as in sink organs of these plants, together with changes in phloem efflux from leaves might affect flowering and tuberization of these plants. Increased translocation rate of soluble sugars was postulated.

Particular aspects of the StSUT4-RNAi phenotype were already described for plants with changes in the gibberellin response or changes in the photoperiodic signaling pathway. In the StSUT4-RNAi leaves a reduction of the transcript level of the GA biosynthetic enzyme StGA20ox1 was observed. However, the complementation of the StSUT4-RNAi phenotype by GA3 treatment was not successful. Simultaneously, increased accumulation of PhyB transcripts was observed in the transgenic plants. The involvement of changes of phytochrome activity might be responsible for the loss of shade avoidance response and partial insensitivity toward the day length. Under shade conditions (or under far red light enrichment), the StSUT4 transcripts accumulated to higher levels. Changes in the expression of genes involved in the photoperiodic pathway were observed in the StSUT4-RNAi plants, which might be responsible for the accelerated flowering and the early tuberization of these plants.

Several genetic signal transduction pathways seem to be deregulated in the StSUT4-RNAi potatoes, suggesting an integrative function of SUT4 in the coordination of the light signaling, the hormone signalling and the sugar signalling pathways of higher plants.

Keywords: sucrose transport, *Solanum tuberosum*, flower induction, tuber induction, photoperiod, gibberellins, sucrose as signaling molecule.

<b>I.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>2</b>
<b>II.</b>	<b>ABSTRACT .....</b>	<b>3</b>
	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>8</b>
<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>11</b>
1.1	PHLOEM .....	11
1.1.1	<i>Anatomie des Phloems .....</i>	<i>12</i>
1.1.2	<i>Physiologie des Phloemtransports .....</i>	<i>13</i>
1.2	SACCHAROSETRANSPORTER.....	15
1.3	SUT1 .....	16
1.3.1	<i>Expression und Lokalisierung.....</i>	<i>17</i>
1.3.2	<i>Phloemmobilität .....</i>	<i>17</i>
1.3.3	<i>SUT1-Regulation.....</i>	<i>18</i>
	Einfluss von Kohlenhydraten .....	18
	Diurnale Rhythmik der <i>SUT1</i> -Expression .....	19
	Redox-Aktivierung.....	19
1.3.4	<i>Physiologische Bedeutung.....</i>	<i>20</i>
	Bedeutung in <i>Sink</i> -Organen.....	21
1.4	SUT2/SUT4.....	22
1.4.1	<i>SUT2.....</i>	<i>23</i>
	Lokalisierung und Funktion.....	23
1.4.2	<i>SUT4.....</i>	<i>25</i>
	Expression und Lokalisierung .....	25
1.4.3	<i>Regulation der SUT2/SUT4 Saccharosetransporter .....</i>	<i>27</i>
1.5	DIE ROLLE DES PHLOEMS BEI DER INTEGRATION VON PFLANZLICHEN FUNKTIONEN .....	28
1.5.1	<i>Blühinduktion.....</i>	<i>29</i>
	Blühintegratoren.....	30
	Photoperiodische Blühinduktion .....	32
	Die Rolle von Gibberellinen für die Blühinduktion.....	34
1.5.2	<i>Induktion der Knollenbildung .....</i>	<i>36</i>
	Regulation durch die Photoperiode.....	36
	Gibberellin-abhängige Knolleninduktion .....	38
1.5.3	<i>Schattenvermeidungsreaktion .....</i>	<i>39</i>
1.5.4	<i>Saccharose als Signalmolekül.....</i>	<i>41</i>
<b>2</b>	<b>ZIELE DER ARBEIT .....</b>	<b>45</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>47</b>
3.1	CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN.....	47
3.2	PFLANZENMATERIAL .....	47
3.3	ANZUCHT, BEHANDLUNG UND VERMEHRUNG DER PFLANZEN .....	48
3.3.1	<i>Gewebekultur .....</i>	<i>48</i>

3.3.2	<i>Präparation der Kartoffel-Stängel für die Sterilkultur</i> .....	48
3.3.3	<i>Erzeugung von in vitro Knollen</i> .....	49
3.3.4	<i>Phytokammer</i> .....	49
3.3.5	<i>Gewächshaus</i> .....	50
3.4	BESCHATTUNGSEXPERIMENT.....	50
3.5	PFROPFVERSUCHE.....	51
3.6	PFLANZENMATERIAL FÜR DIE APEX-ANALYSEN.....	51
3.7	GIBBERELLINSÄURE-BEHANDLUNG.....	51
3.8	BAKTERIENSTÄMME UND ANZUCHT.....	52
3.8.1	<i>Transformation der Bakterien</i> .....	52
3.9	HERSTELLUNG DES RNAi KONSTRUKTES.....	52
3.10	HERSTELLUNG DER <i>StSUT4</i> RNAi KARTOFFELN.....	53
	Verifizierung von transformierten Pflanzen mit NPTII Primer.....	54
	Analyse der transformierten Pflanzen mit Gen-spezifischen Primer.....	54
3.11	QUANTITATIVE TRANSKRIPTANALYSE.....	54
3.11.1	<i>RNA-Isolation aus Pflanzengewebe</i> .....	54
3.11.2	<i>cDNA-Synthese</i> .....	55
3.11.3	<i>Quantitative Echtzeit PCR (real time qPCR)</i> .....	55
3.12	ANALYSE VON KOHLENHYDRATEN.....	57
3.12.1	<i>Enzymatische Bestimmung der löslichen Zucker</i> .....	57
3.12.2	<i>Stärkebestimmung</i> .....	57
3.12.3	<i>Stärkefärbung</i> .....	58
3.12.4	<i>Effluxmessungen</i> .....	58
3.12.5	<i>Knollendichtemessung</i> .....	58
3.13	HPLC ANALYSEN.....	59
3.14	SPEKTROPHOTOMETRISCHE ANTHOCYANBESTIMMUNG.....	60
3.15	STATISTISCHE AUSWERTUNG DER EXPERIMENTE.....	60
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>61</b>
4.1	EXPRESSION DER SACCHAROSETRANSPORTER IN KARTOFFELPFLANZEN.....	61
4.1.1	<i>Quantitative real time PCR (qPCR) als Methode zur Analyse der Genexpression</i> .....	61
4.1.2	<i>Gewebe-spezifische Expression des SUT4</i> .....	62
4.1.3	<i>Analyse der diurnalen Expression der Saccharosetransportern-Gene</i> .....	63
4.1.4	<i>SUT1 Expression in konstanter Dunkelheit</i> .....	65
4.2	HERSTELLUNG DER <i>StSUT4</i> -RNAi DÉsirÉE-KARTOFFELN UND TOMATEN.....	66
4.3	<i>StSUT4</i> EXPRESSION IN <i>StSUT4</i> -RNAi KARTOFFELN.....	67
4.3.1	<i>Source-Blätter</i> .....	67
4.3.2	<i>Blüten</i> .....	68
4.4	<i>SUT1</i> UND <i>SUT2</i> TRANSKRIPTGEHALT IN <i>StSUT4</i> -RNAi KARTOFFELN.....	69
4.5	PHÄNOTYP VON <i>StSUT4</i> -RNAi-KARTOFFELPFLANZEN.....	70
4.5.1	<i>Äußeres Erscheinungsbild</i> .....	70
4.5.2	<i>Blühverhalten</i> .....	72

4.5.3	<i>Knollenphänotyp</i> .....	74
4.6	ANALYSE DES KOHLENHYDRATGEHALTS IN <i>SOURCE</i> -BLÄTTERN .....	76
4.6.1	<i>Bestimmung löslicher Zucker in Source-Blättern</i> .....	76
4.6.2	<i>Stärke-Gehalt</i> .....	77
4.7	SACCHAROSE-EFFLUX .....	79
4.8	KOHLENHYDRATBESTIMMUNG IN <i>SINK</i> -BLÄTTERN .....	80
4.9	KOHLENHYDRATBESTIMMUNG IN <i>SINK</i> -KNOLLEN .....	81
4.10	ANALYSE VON <i>IN VITRO</i> KNOLLEN .....	82
4.10.1	<i>Herstellung der Mikroknollen</i> .....	82
4.10.2	<i>Zuckerbestimmung in Mikroknollen</i> .....	84
4.11	ANALYSE VON <i>StSUT4</i> -RNAI-TOMATEN.....	85
4.12	UNTERSUCHUNGEN DES ZUSAMMENSPIELS DES <i>SUT4</i> MIT GIBBERELLINEN .....	89
4.12.1	<i>GA Komplementationsversuch</i> .....	89
4.12.2	<i>Gibberellinsäure-Applikation in vitro</i> .....	94
4.12.3	<i>Bestimmung von StGA20ox1 Expression</i> .....	95
4.13	UNTERSUCHUNGEN DER SCHATTENVERMEIDUNGSREAKTION .....	96
4.13.1	<i>Analyse der Pflanzen unter gegenseitigen Beschattung</i> .....	96
4.13.2	<i>Beschattungseinfluss auf die relative StSUT4-Expression</i> .....	101
4.13.3	<i>Analyse der Pflanzen unter Bedingungen des „künstlichen Schattens“</i> .....	102
4.13.4	<i>Untersuchungen der relativen Expression von Phytochromen</i> .....	104
4.14	ANALYSE DER PHOTOSYNTHETISCHEN PROZESSE.....	106
4.15	ANALYSE DES CAROTINOIDGEHALTS.....	106
4.16	ANALYSE DES ANTHOCYANGEHALTS .....	108
4.17	SCHATTENVERMEIDUNGSREAKTION IN TABAKPFLANZEN MIT <i>SUT1</i> -ÜBEREXPRESSION .....	109
4.18	UNTERSUCHUNGEN DER PFLANZEN UNTER KT-BEDINGUNGEN.....	111
4.18.1	<i>Phänotyp</i> .....	111
4.18.2	<i>Zuckerbestimmung</i> .....	112
4.18.3	<i>Saccharose-Efflux</i> .....	115
4.18.4	<i>AGPase Bestimmung</i> .....	116
4.19	ANALYSE DER BLÜHINDUKTIONSFAKTOREN .....	117
4.19.1	<i>Saccharose-Bestimmung in Apex</i> .....	117
4.19.2	<i>Analyse von Blühinduktionsgenen</i> .....	119
4.20	PFROPFUNGSEXPERIMENTE.....	121
4.20.1	<i>Pfropfversuche zwischen StSUT4-RNAi und Wildtyp Désirée</i> .....	122
4.20.2	<i>Pfropfversuche zwischen StSUT4-RNAi Désirée und Wildtyp Andigena</i> .....	124
4.21	INHIBIERUNG VON <i>StSUT4</i> IN <i>S. TUBEROSUM</i> SSP. <i>ANDIGENA</i> .....	127
4.22	PHÄNOTYP DER <i>StSUT4</i> -RNAI <i>ANDIGENA</i> -PFLANZEN .....	128
4.22.1	<i>Knollenherstellung unter LT-Bedingungen</i> .....	128
4.22.2	<i>Pflanzenaussehen und Blühverhalten</i> .....	129
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>131</b>
5.1	<i>SUT4</i> -EXPRESSIONSANALYSE.....	131

5.1.1	<i>Quantitative real time PCR als Methode zur Analyse der Genexpression</i> .....	131
5.1.2	<i>Sink-spezifische SUT4-Expression</i> .....	132
	Entwicklungsabhängige <i>SUT4</i> -Expression in Vermehrungsorganen.....	132
	<i>SUT4</i> -Transkriptgehalt im Stängel .....	134
5.1.3	<i>Akkumulation der SUT-Transkripte verändert sich im Laufe des Tages</i> .....	135
5.2	INHIBITION DER <i>SUT4</i> -EXPRESSION MITTELS RNA INTERFERENZ.....	138
5.3	FOLGEN DER <i>StSUT4</i> -INHIBIERUNG .....	138
5.3.1	<i>Inhibierung des StSUT4 führt in Kartoffeln zu Veränderungen im Wachstum, Blühverhalten und in der Knollenherstellung</i> .....	139
5.3.2	<i>Änderungen der Fruchtentwicklung in SISUT4-Tomaten</i> .....	140
5.4	ANALYSE DES KOHLENHYDRATGEHALTS NACH <i>SUT4</i> -INHIBITION .....	143
5.4.1	<i>SUT4</i> -Inhibition verursacht globale Veränderungen des Kohlenhydratgehalts .....	143
5.4.2	<i>Beeinflusst StSUT4 die Funktion von SUT1 negativ?</i> .....	145
5.4.3	<i>Die Aktivität der AGPase ist in StSUT4-RNAi Kartoffeln dereguliert</i> .....	147
5.4.4	<i>Hat Saccharose als Signalmolekül eine Bedeutung für die Generierung des StSUT4-RNAi Phänotyps?</i> .....	150
5.5	VERÄNDERUNGEN DER GA-ANTWORT SIND TEILWEISE FÜR DEN PHÄNOTYP DER <i>StSUT4</i> -RNAi KARTOFFELN VERANTWORTLICH.....	152
5.5.1	<i>Mögliche Interaktion zwischen GA-Antwort und dem Saccharose-Weg</i> .....	156
5.5.2	<i>Mögliche GA-Ethylen Interaktion</i> .....	159
5.5.3	<i>Ist StSUT4 am GA-Signaling beteiligt?</i> .....	160
5.6	<i>StSUT4</i> -RNAi KARTOFFELN ZEIGEN EINE VERÄNDERTE ANTWORT AUF DIE QUALITATIVE UND QUANTITATIVE LICHTVERÄNDERUNGEN .....	161
5.6.1	<i>StSUT4</i> -RNAi Kartoffeln zeigen eine veränderte Reaktion auf die Tageslänge.....	162
	Gene des photoperiodischen Signalwegs der Blüh- und Knolleninduktion zeigen in den <i>StSUT4</i> -RNAi-Pflanzen eine veränderte Expression.....	164
5.6.2	<i>Die Schattenvermeidungsreaktion ist bei den StSUT4-RNAi Pflanzen reduziert</i> .....	167
	Änderungen der hormonellen Antwort, sowie der phytochrom-abhängigen Antwort könnten gemeinsam für die Verringerung der Schattenvermeidungsreaktion in <i>StSUT4</i> -RNAi-Pflanzen verantwortlich sein .....	169
5.7	<i>SUT4 ALS INTEGRATOR VON SIGNALÜBERTRAGUNGSWEGEN, DIE DIE PFLANZLICHE ANTWORT AUF LICHT, HORMONE UND ZUCKER REGULIEREN?</i> .....	170
	<b>LITERATUR</b> .....	<b>173</b>
	<b>ANHANG</b> .....	<b>220</b>
	<b>EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG</b> .....	<b>221</b>
	<b>DANKSAGUNG</b> .....	<b>222</b>
	<b>PUBLIKATIONSLISTE</b> .....	<b>224</b>

## Abkürzungsverzeichnis

A	Amper
A	Antheraxanthin
ADP	Adenosindiphosphat
AGPase	ADP-Glucosepyrophosphorylase
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albmine)
CaMV	Cauliflower Mosaic Virus
CHX	Cykloheximid
CO	CONSTANS
COL1	CONSTANS-like 1
COL3	CONSTANS-like 3
Da	Dalton
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DEPS	De-Epoxidations-Status
DR	Dunkelrot
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	und andere
eV	Elektronenvolt
FG	Frischgewicht
FT	FLOWERING LOCUS T
g	Erdebeschleunigung
GA	Gibberellin
GA3	Gibberellinsäure
GA3ox	GA3-Oxidase
GA2ox	GA2-Oxidase
GA20ox	GA20-Oxidase
GAs	Gibberelline
GI	GIGANTEA
Hd1	Heading date 1; CO-Ortholog aus Reis



Hd3a	Heading date 3a; FT-Ortholog aus Reis
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
HR	Hellrot
Kan	Kanamycin
Km	Michaeliskonstante-Wert
KT	Kurztag
LT	Langtag
MES	N-Morpholino-ethansulfonsäure
MS	Murashige-Skoog Medium
OD	Optische Dichte
PCMBS	Chloromercuribenzenesulfoniksäure
PCR	PCR Polymerase-Ketten-Reaktion (polymerase chain reaction)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
Pi	anorganisches Phosphat
PPFD	photosynthetic photon flux density
Pr	Hellrotform der Phytochrome
Pfr	Dunkelrotform der Phytochrome
qPCR	quantitative real time PCR
RNase	Ribonukleinase
rpm	Umdrehungen pro Minute (rotations per minute)
RPA	RNase Protection Assay
SE	Standardfehler
SD	Standardabweichung
SFT	SINGLE FLOWER TRUSS; FT-Ortholog aus Tomato
SM	Sprossmeristem
SOC1	SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CO auch als AGAMOUS-LIKE 20 (AGL20) bekannt
T	Thymin
T6P	Trehalose-6-Phosphat
TG	Trockengewicht
Tris	Tris-hydroxymethylaminoethan
TEF1	Translation Elongations-Faktor EF-1 $\alpha$ (TEF1)
U	Enzymeinheit
UBI3	Ubiquitin 3

UV-Licht	Ultraviolett-Licht
V	Violaxanthin
v/v	Volumen pro Volumen
Vis-Licht	sichtbares Licht
Vol	Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
Z	Zeaxanthin
$\lambda$	Bakteriophage $\lambda$

# 1 Einleitung

Mit Hilfe der Lichtenergie stellen grüne Pflanzen aus anorganischer Materie reduzierte Kohlenstoffverbindungen (sog. Photoassimilate) her, die für Wachstums- und Speicherprozesse genutzt werden. Für die Produktion und den Export von Kohlenstoffverbindungen sind die *Source*-Organe der Pflanzen verantwortlich; vor allem grüne reife Blätter, sog. *Source*-Blätter, stellen die Hauptquelle der Photoassimilate dar und beliefern den ganzen Organismus mit den während der Photosynthese entstehenden Nährstoffmolekülen (Assimilate). Ein besonderes Beispiel für ein *Source*-Organ ist eine keimende Kartoffelknolle, die eine Nährstoff-Quelle für die wachsende junge Pflanze darstellt. Pflanzliche Organe, in denen die Assimilate entweder verbraucht oder deponiert werden, werden als *Sink*-Organe bezeichnet. Dazu gehören heterotrophe Organe wie z.B. Wurzeln, Knospen oder sehr junge Blätter, sowie auch generative Organe. Die sich entwickelnden Kartoffelknollen, die Saccharose (bzw. Hexosen) importieren, um sie in Stärke umzuwandeln und zu deponieren, sind ein Beispiel für ein Speicher-*Sink*-Organ (zur Übersicht: Schopfer und Brennicke, 1999; Taiz und Zeiger, 2006)

## 1.1 Phloem

Im Laufe der Evolution entwickelten höhere Pflanzen ein Langstreckentransportsystem, das Phloem, das eine erfolgreiche Distribution der Photosyntheseprodukte von *Source*- zu den verschiedenen *Sink*-Organen gravitationsunabhängig ermöglicht. Der Phloemtransport verläuft selbst passiv. Der Prozess ist jedoch von verschiedenen Energie-verbrauchenden Kurzstrecken-Transportmechanismen, die die Beladung und Entladung des Phloems antreiben, abhängig (Taiz und Zeiger, 2006). Sowohl die Beladung, wie auch die Entladung des Phloems sind Energie-abhängige Prozesse, für die eine Beteiligung von Saccharosetransportern postuliert wurde ( Riesmeier *et al.*, 1994, Kühn *et al.*, 1996, Bürkle *et al.*, 1998, Weise *et al.*, 2000, Hackel *et al.*, 2006, Voitsekhovskaja *et al.*, 2006). Den Mechanismus des Phloemtransports erklärt am besten die Druckstromtheorie (Münch, 1930). Die im Phloem von *Source*-Organen (*collection phloem*) infolge aktiver Phloembeladung entstehende hohe Substratkonzentration bewirkt einen passiven Wassereinfluss und führt zum Anstieg des osmotischen Drucks, der

das Substrat von *Source* zu *Sink* treibt. Im Phloem des *Sink*-Gewebes (*unloading/delivery phloem*) kommt es zur Entladung der zuvor importierten Stoffe, was zur Verminderung des osmotischen Drucks im *Sink*-Bereich führt (Münch, 1930; Van Bel, 2003; Carpaneto *et al.*, 2005). Die Energiezufuhr ist auch für Regulationsprozesse des Phloemtransports (z.B. Regulation des Turgors), sowie für die Wiederaufnahme der Moleküle, die aufgrund des osmotischen Gefälles aus dem Transportphloem (*transport phloem*) hinaus diffundieren, also für sog. *retrieval* Funktionen nötig. Die *retrieval* Funktion entlang des Transportphloems im Fall von Saccharose übernehmen vermutlich auch Saccharosetransporter (Williams *et al.*, 2000, Van Bel, 2003; Teiz und Zeiger, 2006). Die Ko-Lokalisation der Saccharosetransporter-Proteine aus *Solanaceae* SUT1, SUT2 und SUT4 in Siebelementen der Hauptadern von *Source*-Blättern und *Sink*-Blättern, von Petiolen und vom Stängel mittels Immunolokalisationsmethoden weist auf ihre wichtige Funktion entlang des Transportphloems hin (Weise *et al.*, 2000, Barker *et al.*, 2000, Reinders *et al.*, 2002)

### **1.1.1 Anatomie des Phloems**

Den höchsten Entwicklungsgrad des Phloemgewebes erreichten Angiospermen. Das Phloem besteht aus einem System von verzweigten Kapillaren, sog. Siebröhren, die die ganze Pflanze durchziehen. Die Siebröhren bestehen aus lang gestreckten, äußerst spezialisierten Zellen, sog. Siebelementen (SEs, *sieve elements*), die über Siebplatten miteinander verbunden sind. Siebplatten sind Zellwände an den Enden der Zellen, die durch zahlreiche Siebporen durchlöchert sind, die sich phylogenetisch und ontogenetisch auf Plasmodesmen (PD, *plasmodesmata*) (Plasmodesmenaggregate) zurückführen lassen (Sjölund, 1997). Die reifen funktionellen Siebelemente sind lebende Zellen, deren Aufbau jedoch im Zuge der Differenzierung erheblich vereinfacht wurde. Es kam zum Zerfall, Desintegration oder Umstrukturierung von wichtigen Zellorganellen, was eine perfekte Anpassung an die zu erfüllende Transportfunktionen und dadurch die Erhöhung der Molekültransport-Effektivität ermöglicht. Aber der Mangel von vielen lebenswichtigen Zellorganellen macht die Siebelemente von benachbarten Geleitzellen (CC, *companion cells*) abhängig. Geleitzellen sind Zellen des Phloems, die im Gegensatz zu den Siebelementen, Zellkerne und alle lebenswichtige Bestandteile besitzen. Besonders reich sind sie an Mitochondrien. Die Geleitzellen bieten den Siebelementen wichtige Proteine und Metabolite, die für die Unterstützung der Lebensfunktionen von Siebelementen

benötigt werden und nehmen auch an der Beladung der Siebelemente mit Transportmolekülen teil. Siebelemente sind mit den Geleitzellen über zahlreiche verzweigte Plasmodesmata verbunden. In vielen Pflanzenarten, unter anderen bei Solanaceen, entsteht dabei ein funktioneller Komplex, der kurz als SE-CCC (*sieve elements companion cell complex*) bezeichnet wird (zur Übersicht: Schopfer und Brennicke, 1999; Kühn, 2003; Van Bel, 2003; Teiz und Zeiger, 2006).

### **1.1.2 Physiologie des Phloemtransports**

Zahlreiche Transportformen von Photoassimilaten wurden in verschiedenen Pflanzen detektiert. Die häufigste Transportform der Photoassimilate ist Saccharose, die auch in Kartoffelpflanzen überwiegt. Saccharose wird im Cytoplasma von Mesophyllzellen synthetisiert. Im Innern des Blattes wird die Saccharose zwischen Mesophyllzellen in Richtung der Leitbahnen dank zahlreicher Plasmodesmen, die die Mesophyllzellen verbinden, symplastisch transportiert. In kleineren Adern des Blattes, erfolgt die Beladung von Saccharose in den SECC Komplex. Phloembeladung kann entweder durch die symplastischen Verbindungen zwischen SECCC und direkt anliegenden Zellen (symplastisch) oder durch eine aktive Aufnahme der Saccharose durch den SECC-Komplex vom extrazellulären Raum (apoplastisch) ablaufen (van Bel *et al.*, 1992; zur Übersicht: Schopfer und Brennicke, 1999; Kühn, 2003; Van Bel, 2003; Lough und Lucas, 2006; Taiz und Zeiger, 2006).

Obwohl die genauen Mechanismen der apoplastischen Saccharosephloembeladung bisher nicht geklärt wurden, wurde die essentielle Rolle von Plasmamembran-gebundenen Saccharose- $H^+$  Symportern der SUT1-Klasse sowie auch von Protonenpumpen ( $H^+$ -ATPase), die für die Generation des elektrochemischen Gradienten nötig sind, nachgewiesen (DeWitt und Sussman, 1995; Sjölund, 1997; Carpaneto *et al.*, 2005).

Die vom *Source* importierten Photoassimilate verlassen das Phloem (sog. *delivery phloem*) im Bereich der *Sink*-Organe (Phloementladung) und werden dann weiter zwischen den Zellen des benachbarten Gewebes transportiert (sog. post-Phloemtransport). Ähnlich wie bei der

Phloembeladung können die Zucker entweder apoplastisch oder symplastisch vom Phloem zu den benachbarten Parenchymzellen transportiert werden (Patrick und Offler, 1996).

Mechanismen der Phloementladung können sich in verschiedenen heterotrophen Organen unterscheiden und während ihrer Entwicklung verändern. Bewegungsuntersuchungen von fluoreszierenden Molekülen ermöglichten, in verschiedenen Pflanzen eine symplastische Phloementladung in *Sink*-Organen wie jungen Blättern, Blütenblättern, Wurzelspitzen oder Antheren nachzuweisen (Roberts *et al.*, 1997, Imlau *et al.*, 1999, Oparka *et al.*, 1999).

In manchen Pflanzenstrukturen, wie Pollenzellen oder dem Pflanzenembryo, ist dagegen die symplastische Phloementladung, wegen der vollständigen symplastischen Isolierung vom benachbarten Gewebe unmöglich. Solche Gewebe sind von der Zuckeraufnahme aus dem Apoplasten abhängig. An der apoplastischen Phloementladung wurde die Teilnahme von Zuckertransportern postuliert. Während der apoplastischen Phloementladung kommt es zum Saccharoseexport aus dem SECCC in den extrazellulären Raum. Die Saccharose kann dann entweder aktiv durch Saccharosetransporter direkt in die Parenchymzellen transportiert werden, oder durch eine apoplastische Invertase verdaut werden. Nach der Spaltung werden die entstehenden Hexosen mittels entsprechender Hexosetransporter in die benachbarten Zellen transportiert (Williams *et al.*, 2000). Die Saccharosespaltung im Apoplasten des *Sink*-Gewebes bewirkt einen chemischen und osmotischen Gradienten zwischen dem SECCC und dem benachbarten Gewebe (Kühn, 2003).

Beteiligung von Saccharosetransportern an der Phloementladung wurde unter anderem während der Prozesse der Pollenreifung und -Keimung postuliert (Stadler *et al.*, 1999; Lemoine *et al.*, 1999; Hackel *et al.*, 2006; Sivitz *et al.*, 2008). Saccharosetransporter können auch Bedeutung während der Fruchtentwicklung bei Solanaceen haben. Die Untersuchungen der Tomaten mit inhibierter *SISUT2*-Expression weisen auf die Bedeutung des apoplastischen Zuckertransports schon in den frühesten Phasen der Fruchtentwicklung (Hackel *et al.*, 2006). Im Laufe der Knollenentwicklung kommt es zur Änderung des Phloementladungsmechanismus. In dem wachsenden Stolon, sowie auch in den frühesten Knollenentwicklungsstadien, noch bevor der

erste sichtbare Stolon erscheint, dominiert die apoplastische Phloementladung, während die symplastische Knollenentladung erst in sichtbaren Knollen stattfindet (Viola *et al.*, 2007). Die Detektion von Saccharosetransportern in Knollen, und die Experimente mit der direkten knollenspezifischen Inhibition der SUT1- Expression suggerieren, dass Saccharosetransporter auch während der „symplastischen Knollenentladungsphase“ Bedeutung haben können (Kühn *et al.*, 2003).

## 1.2 Saccharosetransporter

Noch bevor der erste Saccharosetransporter bekannt war, wurden die Mechanismen der Saccharoseaufnahme intensiv untersucht (Giaquinta, 1977; Delrot, 1981; Delrot und Bonnemain, 1981). Die Isolierung der Gene für Saccharose-transportierende Membranproteine und die Analyse der kinetischen Eigenschaften ließ unser Verständnis über Mechanismen des Saccharosetransports beträchtlich vertiefen.

Die Saccharosetransporter sind hydrophobe integrale Membranproteine, die von einer mittelgroßen Genfamilie, der SUT-Familie (SUCROSE TRANSPORTER) kodiert werden. Die Proteine bestehen aus 2 homologen Domänen, die sich durch den Besitz von jeweils sechs Membranspannen  $\alpha$ -helikaler Struktur auszeichnen und mit einem zentralen *loop* miteinander verbunden sind. Es wird postuliert, dass die Domänen infolge einer Genduplikation mit anschließender Genfusion im Laufe der Evolution entstanden sind (Williams *et al.*, 2000).

Die bisher in verschiedenen Pflanzen identifizierten Saccharosetransporter bzw. Saccharosetransporter-ähnlichen Proteine wurden gemäß ihrer Sequenzhomologie in 3 Untergruppen (Subfamilien): SUT1, SUT2 und SUT4 aufgeteilt (Kühn, 2003). In *Solanaceen* wurden vier verschiedene SUT mit Vertretern in allen drei Subfamilien identifiziert (Kühn, 2003). In *Nicotiana*-Gattungen wurde bislang kein Vertreter der SUT2-Genfamilie identifiziert und es konnten keine SUT2 ESTs bei einer EST-Datenbank-Analyse gefunden werden (Hackel *et al.*, 2006). Aus Tabak (*Nicotiana tabacum*) wurde jedoch ein Pollen- und Antheren-spezifisches SUT3-Gen kloniert, das hinsichtlich seiner Genstruktur der SUT1-Subfamilie zugeordnet

wurde (Bürkle *et al.*, 1998, Lemoine *et al.*, 1999). Keine SUT3-ESTs wurden dagegen in Tomaten und Kartoffeln gefunden (Kühn, 2003; Hackel *et al.*, 2006).

Saccharosetransporter aus *Arabidopsis* und aus der *Solanaceen*-Familie gehören zu den am besten charakterisierten. Obwohl *Arabidopsis thaliana* eine der wichtigsten Modellpflanzen für die Pflanzenforschung darstellt, kann man nur selten die für *Arabidopsis* charakteristischen Saccharosetransporter-Daten auf die *Solanaceae*-Pflanzen übertragen, da es anatomische und physiologische Unterschiede zwischen den zwei Pflanzenarten gibt (van Bel *et al.*, 1992; Williams *et al.*, 2000; Kühn, 2003; Meyer *et al.*, 2004).

Während die mit unterschiedlichen Methoden durchgeführten Analysen auf die Bedeutung von symplastischen und apoplastischen Phloembeladungsmechanismen in *Arabidopsis* hinweisen, wurde für die *Solanaceae*-Pflanzen die Dominanz von aktiven Phloembeladungsmechanismen postuliert. Für die Notwendigkeit einer aktiven Phloembeladung in den Solanaceen spricht unter anderem ein hohes Konzentrationsgefälle zwischen dem Phloem der *Source*-Organe, wo die Saccharosekonzentration nahezu 1M beträgt und den Mesophyllzellen, wo die Saccharosekonzentration nur bei etwa 0,1 M liegt (Leggiewie, 1996). Saccharose stellt bei Solanaceen eine Haupttransportform der Photoassimilate dar, während im Phloemsaft von *Arabidopsis*-Pflanzen außer Saccharose auch die Zucker der Raffinosefamilie zu finden sind, was für Pflanzen mit symplastischem Phloembeladungsmechanismus charakteristisch ist (Kühn, 2003).

### 1.3 SUT1

Der Hefestamm SuSy7, der wegen Deletion eines Invertase-Gens nicht fähig ist, auf saccharosehaltigem Medium zu wachsen, wurde für die Isolierung des ersten Saccharosetransporter-Gens aus Spinat (*SoSUT1*, Riesmeier *et al.*, 1992) und Kartoffel (*StSUT1*, Riesmeier *et al.*, 1993) verwendet. Danach wurden *SUT1* Genhomologe in verschiedenen Pflanzenarten, unter anderem in *Arabidopsis* (*AtSUC1* und *AtSUC2*, Sauer und Stolz, 1994) sowie in den in dieser Arbeit verwendeten Solanaceen (Tomate, *SISUT1*, Barker *et al.*, 2000 und Tabak, *NtSUT1*, Bürkle *et al.*, 1998) identifiziert.



Die SUT1-Proteine gehören zu den hochaffinen Saccharosetransportern mit  $K_m$ -Werten zwischen  $139\mu\text{M}$  und  $1,5\text{ mM}$  und funktionieren als Saccharose/Protonen-Cotransporter mit einer 1:1 Stöchiometrie ( $1\text{H}^+ : 1\text{Saccharose}$ ), was elektrophysiologische Analysen in *Xenopus* Oozyten zeigten (Boorer *et al.*, 1996; Zhou *et al.*, 1997; berichtet in: Kühn, 2003). Aus den elektrophysiologischen Daten wurde ein Modell erstellt, nach dem das SUT1-Protein zuerst ein Proton dann ein Saccharose-Molekül bindet und es anschließend zu einem simultanen Transfer von beiden Liganden durch die Plasmamembran kommt (Boorer *et al.*, 1996).

### **1.3.1 Expression und Lokalisierung**

Analysen des *SUT1*-Transkriptgehalts zeigten eine starke Expression des Gens im *Source*-Blatt und dagegen schwächere in *Sink*-Organen (Riesmeier *et al.*, 1993). Das SUT1 Protein aus *Solanaceae* wurde mithilfe spezifischer affinitätsgereinigter Antiseren in den Siebelementen des Phloems verschiedener Organe nachgewiesen (Kühn *et al.*, 1997, Barker *et al.*, 2000, Weise *et al.*, 2000, Reinders *et al.*, 2002; Krügel *et al.*, 2008). *SUT1*-Transkripte wurden dagegen sowohl in den Siebelementen, als auch in den benachbarten Geleitzellen nachgewiesen, bevorzugt an den Öffnungen der verzweigten Plasmodesmen, die die Geleitzellen mit den Siebelementen verbinden. Es wurde postuliert, dass die *SUT1*-Transkription in den kernhaltigen Geleitzellen erfolgt und die *SUT1* mRNA anschließend über die Plasmodesmen in die Siebelemente transportiert wird, wo letztendlich die Translation und der korrekte Einbau des Membranproteins in die Plasmamembran stattfindet (Kühn *et al.*, 1997). Erfolgreiche Antisense-Inhibierung der *SUT1*-Expression unter Verwendung eines Geleitzell-spezifischen Promotors (*rolC*-Promotor) bestätigte die Hypothese der geleitzell-spezifischen Transkription in transgenen Kartoffelpflanzen (Kühn *et al.*, 1996). Kürzlich konnte auch durch verschiedene Methoden die Phloem-Mobilität der *SUT1* mRNA unterschiedlicher Spezies (Kartoffel, Tomate, Tabak, Spinat) experimentell nachgewiesen werden (He *et al.*, 2008).

### **1.3.2 Phloemmobilität**

Das Vorhandensein von *SUT1* mRNA im Phloemsaft verschiedener Pflanzenarten wurde mit Hilfe von RT-PCR und unter Verwendung der sog. Aphidentechnik nachgewiesen und kann

auf mögliche Phloemmobilität der *SUT1*-Transkripte hinweisen (Doering-Saad *et al.*, 2002; Knop *et al.*, 2001) Kürzlich wurden die Transkripte von *StSUT1* und *NtSUT1* in einem auf den entsprechenden *Solanaceen* wachsenden Holoparasit *Cuscuta reflexa* mittels RT-PCR und *real time* PCR (qPCR) Methoden detektiert (He *et al.*, 2008). Im Fall von *StSUT1* wurde das Vollängen-Transkript von 1.7 kb detektiert, was auf eine RNA-Stabilisierung während des Langstreckentransports hinweist (He *et al.*, 2008). Eine Phloemmobilität der *SUT1*-Transkripte konnte sowohl zwischen gepfropften *SoSUT1-c-myc* Überexpressionspflanzen unter Kontrolle des *CaMV35S* Promotors (Leggewie *et al.*, 2003), als auch zwischen transgenen *SISUT1*-Promotor::*GUS* Pflanzen (Lalonde *et al.*, 2003) und dem jeweiligen WT nachgewiesen werden. Mittels qRT-PCR wurde die Phloemmobilität beider Transkripte zwischen gepfropften transgenen Pflanzen and WT Pflanzen festgestellt (He *et al.*, 2008). Der Nachweis der Phloemmobilität der *SoSUT1-c-myc*-Transkripte war möglich, obwohl das *c-myc* Konstrukt weder am 5'-, noch am 3' Bereich über untranslatierte Regionen (UTRs) verfügte (Leggewie *et al.*, 2003, He *et al.*, 2008).

### 1.3.3 SUT1-Regulation

Bisher wurde eine Regulation der SUT1-Aktivität auf verschiedenen Ebenen beschrieben. Die relativ kurze Halbwertszeit des SUT1 Proteins (< 4h) und der *SUT1* Transkripte (60-80 min) und die komplexe Form der Regulation zeugen davon, dass in den kernlosen Siebelementen eine ständige Neusynthese des Proteins notwendig ist (Kühn *et al.*, 1997; He *et al.*, 2008).

#### Einfluss von Kohlenhydraten

In Kartoffeln und Tomaten wurde kein Saccharose-Effekt auf die SUT1-Expression beobachtet (Harms *et al.*, 1994, Barker *et al.*, 2000). Jedoch die unter Verwendung des Web Signal Scan Programms durchgeführte Analyse der *SISUT1*-Promotorsequenz zeigte die Anwesenheit von Promotor-Sequenzmotiven, die für Zucker-Repression verantwortlich sind (He *et al.*, 2008). Untersuchungen eines SUT1 Saccharosetransporters aus Zuckerrübe, BvSUT1, zeigten einen negativen Effekt der Saccharose auf die SUT1-Aktivität, sowie auf die *SUT1* mRNA-Stabilität in den Blättern (Chiou und Bush 1998; Vaughn *et al.*, 2002).

## Diurnale Rhythmik der *SUT1*-Expression

Die Akkumulation sowohl der *SUT1*-mRNA, als auch die des SUT1-Proteins in Blättern wird durch Licht gesteuert (Kühn *et al.*, 1997). Analyse der Halbwertszeit der *SUT1* mRNA und des Proteins in *Solanaceae* weist darauf hin, dass das SUT1-Expressionsmuster einer diurnalen Rhythmik folgt und somit hervorragend der Photosyntheseleistung der Blätter angepasst ist (Kühn *et al.*, 1997). Transgene Kartoffelpflanzen, die das *SoSUT1*-Gen unter Kontrolle des CaMV 35S-Promotors überexprimieren, sollten klären, ob die diurnale Expression transkriptional oder post-transkriptional reguliert wird. Die *real time* PCR Analysen zeigten, dass die diurnale Regulation der *SUT1*-Expression in 35S::*SoSUT1* Pflanzen gestört ist. Außerdem war die Transkriptakkumulation des unter konstitutivem 35S Promotor exprimierten *SUT1*-Gens im Gegensatz zu dem *SUT1*-Gen unter endogenem Promotor nach Behandlung mit dem Translationsinhibitor Cycloheximid (CHX) nicht beeinträchtigt. Anhand dieser Ergebnisse wurde eine transkriptionale Kontrolle der *SUT1*-Expression unter Beteiligung *cis*-regulatorischer Elemente im *SUT1*-Promotor, sowie kurzlebiger positiver Transkriptionsfaktoren, die daran binden, postuliert. Im *SUT1*-Promotor wurde mit Hilfe des Web Signal Scan Programms auch ein für zirkadiane Expression verantwortliches *cis*-Element lokalisiert (He *et al.*, 2008). Bei diesem Sequenzmotiv handelt es sich um ein imperfektes EE-Element (*evening element*), das für die Abend-Oscillation zirkadian regulierter Gene verantwortlich ist (Harmer und Kay, 2005).

## Redox-Aktivierung

Kürzlich zeigten Untersuchungen in *Saccharomyces cerevisiae*, die *StSUT1* heterolog exprimierten, sowie in Oocyten von *Xenopus laevis*, die *SUT1* aus *Zea mays* exprimierten, dass die SUT1-Saccharosetransportaktivität durch eine Redox-abhängige Homodimerisierung stark erhöht ist (Krügel *et al.*, 2008). Unterschiedliche Methoden wie Blue native PAGE (BN-PAGE), chemisches *Cross-Linking*, Immunoprecipitation, Analyse transgener Pflanzen mit reduzierter *SUT1*-Expression oder *SUT1*-Überexpression, sowie Untersuchungen von transient transformierten Tabakpflanzen mittels *split yellow fluorescent protein* (Split YFP)-Technik weisen auf die regulatorische Bedeutung der *SUT1*-Dimerisierung *in planta* (Krügel *et al.*, 2008; Liesche *et al.*, 2008). Wie mit Hilfe eines GFP-Fusionskonstruktes gezeigt wur-

de, ist die Redox-abhängige Dimerisierung auch für das subzelluläre *targeting* des SUT1 zur Plasmamembran essentiell, wo sich das SUT1-Protein in 200- bis 300-nm *raft*-ähnlichen Microdomänen konzentriert (Krügel *et al.*, 2008). Es wurde postuliert, dass die Regulation der SUT1-Aktivität durch Homodimerisierung universell bei verschiedenen Pflanzenarten sein kann (Liesche *et al.*, 2008).

### 1.3.4 Physiologische Bedeutung

Die detaillierte Analyse der physiologischen Funktion des SUT1 Saccharosetransporters mithilfe genetisch modifizierter Pflanzen hat es ermöglicht, die Bedeutung des SUT1 sowohl für die Phloembeladung, als auch für den Langstreckentransport nachzuweisen (Riesmeier *et al.*, 1994, Kühn *et al.*, 1996, Bürkle *et al.*, 1998, Hackel *et al.*, 2006).

Transgene Kartoffel- und Tabakpflanzen mit konstitutiver Antisense-Inhibierung der *SUT1*-Expression unter Verwendung des *CaMV* 35S-Promotors aber auch transgene Kartoffel und Tomaten, in denen die *SUT1*-Expression nur in den Geleitzellen des Phloems mittels *rol-C*-Promotor spezifisch inhibiert wurde, zeigten im Vergleich zum Wildtyp einen charakteristischen Phänotyp mit retardiertem Wachstum und deformierten *Source*-Blättern mit einer erhöhten Akkumulation von löslichen Zuckern, bis hin zum reduzierten Wurzelsystem und Sterilität der Blüten (Riesmeier *et al.*, 1994; Kühn *et al.*, 1996; Bürkle *et al.*, 1998; Hackel *et al.*, 2006). Bei den transgenen Kartoffeln war dazu noch die verminderte Ausbildung der Knollen zu beobachten (Riesmeier *et al.*, 1994; Kühn *et al.*, 1996,). Die Exportrate radioaktiv markierter Saccharose aus den transgenen Tabak-Blättern war im Vergleich zum Wildtyp merklich vermindert (Bürkle *et al.*, 1998). Während einer verlängerten Dunkelperiode haben die Blätter von Antisense Tabak- und Tomatenpflanzen Stärke akkumuliert (Bürkle *et al.*, 1998; Hackel *et al.*, 2006). Ein ähnlicher Phänotyp, wie bei den Antisense-*SUT1*-Pflanzen, wurde auch in *Arabidopsis*-Insertionsmutanten beobachtet, in denen der *SUT1*-homologe *AtSUC2* inhibiert wurde (Gottwald *et al.*, 2000).

Heterologe Überexpression des *SoSUT1* aus Spinat unter Kontrolle eines CaMV 35S-Promotor ermöglichte es, transgene Kartoffel- und Tabakpflanzen herzustellen, die eine erhöhte Saccharosetransportaktivität in Plasmamembranvesikeln zeigten (Leggiewie, 1996; Leggiewie *et al.*, 2003). Transgene Kartoffeln mit SUT1-Überexpression zeigten unter anderem einen veränderten Kohlenhydrat-Metabolismus. Der Gehalt von löslichen Zuckern in Blättern der transgenen Kartoffel war niedriger als beim Wildtyp. Dazu kam es in den transgenen Blättern während der Dunkelperiode zum erhöhten Stärkeabbau. Im Gegensatz dazu weisen die transgenen Knollen einen erhöhten Kohlenhydrat-Gehalt auf. Die *SUT1*-Überexpression beeinflusste die Knollenmorphologie jedoch nicht (Leggiewie, 2003). Transgene Tabakpflanzen mit *SUT1* Überexpression zeigten hingegen eine vermehrte Seitentriebbildung und ein etwas früheres Einsetzen der Blütenbildung sowie auch des Erblühens selbst. Der veränderte Phänotyp der transgenen Tabakpflanzen war jedoch nur im Sommer zu beobachten, was auf eine Abhängigkeit des Effekts vom Licht (oder von der Tageslänge/Photoperiode) hinweist (Leggiewie, 1996).

### Bedeutung in Sink-Organen

Transgene *Arabidopsis* Pflanzen, die das  $\beta$ -Glucuronidase (GUS)-Gen unter Kontrolle des *AtSUC2*-Promotors exprimieren, zeigen in einer histochemischen Färbung ein Expressionsmuster, das neben einer starken Aktivität im Phloem auch eine Aktivität in Wurzeln und Schoten erkennen lässt (Truernit *et al.*, 1995). Expression des *Arabidopsis*-Saccharosetransporters *AtSUC1* wurde in Wurzeln, sowie in keimenden Pollen nachgewiesen, wo eine indirekte Bedeutung in der Regulation der Antherenöffnung postuliert wurde (Stadler *et al.*, 1999; Sivitz *et al.*, 2008). Mit Hilfe von *suc1 Arabidopsis*-Mutanten wurde kürzlich die Bedeutung von *AtSUC1* für die Pollen-Entwicklung und -Keimung bestätigt (Sivitz *et al.*, 2008). Ähnliche Funktionen wurden auch für den Pollen-spezifisch exprimierten zur SUT1-Subfamilie gehörenden *NtSUT3* aus Tabak postuliert (Lemoine *et al.*, 1999).

Mittels qPCR wurde die Expression von *SISUT1* in Tomatenfrüchten untersucht. Der *SISUT1*-Gehalt war in grünen Früchten signifikant höher als in roten Früchten. Mit Hilfe von Immunolokalisierungstechniken wurde *SISUT1* in Siebelementen von jungen, sowie auch reifen

Tomatefruchten lokalisiert. Anhand der Befunde wurde eine Rolle des Proteins bei der Phloementladung während der Tomatenfruchtentwicklung suggeriert (Hackel *et al.*, 2006).

Untersuchungen der Expression des GUS-Gens unter Kontrolle des *SUT1*-Promotors in transgenen Kartoffelpflanzen haben die *SUT1*-Promotoraktivität im Phloem von *Sink*-Knollen nachgewiesen (Kühn *et al.*, 2003). Immunlokalisationsversuche haben gezeigt, dass das SUT1-Protein in den Siebelementen der Knollen vorkommt (Kühn *et al.*, 2003). Die Antisense-Inhibierung der *SUT1*-Expression in Knollen, unter Verwendung des knollenspezifischen Patatin-Klasse I-Promotors B33, der vor allem im Phloem von sich entwickelnden Knollen aktiv ist, verursachte eine Reduktion des Frischgewichts während der frühesten Knollenentwicklungsphase. Es wurde postuliert, dass StSUT1 entweder direkt an der apoplastischen Phloementladung in frühesten Stadien der Knollenentwicklung teilnimmt oder dank der *retrieval* Funktion indirekt die Phloementladung durch Regulation der apoplastischen Osmolarität und der Plasmodesmatafunktion beeinflusst. Eine Beteiligung des SUT1 an der Phloementladung würde implizieren, dass das Protein nicht nur als Saccharoseimporter in das Phloem, sondern auch in umgekehrter Orientierung, als Exporter aus dem SECCC zum Apoplast, funktionieren kann (Kühn *et al.*, 2003). Mittels elektrophysiologischer Methoden unter Verwendung von *Xenopus*-Oozyten wurde der bidirektionale Saccharosetransport des Transporters *ZmSUT1* aus *Zea mays* *in vitro* bereits nachgewiesen (Carpaneto *et al.*, 2005).

## 1.4 SUT2/SUT4

Im Gegensatz zur SUT1-Familie, sind Vertreter der SUT2- und SUT4-Genfamilien in allen bekannten Fällen nur einmal in der jeweiligen Pflanzenart repräsentiert. Die Vertreter der SUT2- und SUT4- Genfamilien wurden bislang nicht sehr eingehend untersucht. Ihre kinetischen und strukturellen Eigenschaften jedoch, sowie auch die viel schwächere Expression, die teilweise durch niedrigen Codon Bias und durch die geringe Stabilität der mRNA verursacht wird und vor allem in pflanzlichen *Sink*-Organen stattfindet, könnten auf eine von SUT1 unterschiedliche physiologische Funktion der SUT2/SUT4 Saccharosetransporter hinweisen (Kühn, 2003; He *et al.*, 2008).

### 1.4.1 SUT2

Die SUT2-Subfamilie besteht aus 2 kleineren Gruppen: eine davon umfasst ausschließlich Saccharosetransporter monokotyle Spezies und die zweite umfasst Saccharosetransporter und Saccharosetransporter-ähnliche Proteine aus Mono- und Dikotyledonen, die entweder eine sehr niedrige Affinität oder gar keine Saccharosetransportfunktion zeigen (Kühn, 2003). Zum ersten Mal wurde das Saccharosetransporter-ähnliche Protein SUT2 in *Arabidopsis* (*AtSUT2/AtSUC3*) und in Tomaten (*SISUT2*) beschrieben (Barker *et al.*, 2000). Die Struktur der dikotylen SUT2-Proteine zeichnet sich durch eine verlängerte N-terminale Domäne (~30 Aminosäuren-Reste) und einen größeren zentralen *loop* (~50 Aminosäuren-Resten) aus (Barker *et al.*, 2000).

Die Untersuchungen in Hefe haben keine Transportaktivität der *SISUT2* und *StSUT2* Proteine gezeigt. Der SUT2-orthologe Transporter aus *Arabidopsis thaliana*, *AtSUC3/AtSUT2*, ist hingegen fähig, Saccharose mit geringerer Transportrate und Affinität ( $K_m=11,7\text{mM}$  bei pH4) zu transportieren (Barker *et al.*, 2000, Meyer *et al.*, 2004).

#### Lokalisierung und Funktion

*SUT2* wird vor allem in *Sink*-Organen wie *Sink*-Blättern, Stängeln und Früchten exprimiert (Barker *et al.*, 2000, Meyer *et al.*, 2004, Hackel *et al.*, 2006). Verschiedene mögliche Funktionen des SUT2 in Pflanzen wie z.B. Katalyse des Saccharose-Transfers über die Plasmamembran oder sensorische Funktionen wurden diskutiert (Barker *et al.*, 2000; Meyer *et al.*, 2004). Auch die potentielle Bedeutung des SUT2 für die Regulation von anderen SUT-Proteinen wurde in Betracht gezogen (Stadler and Sauer, 1996; Reinders *et al.*, 2002; Kühn 2003; Schulze *et al.*, 2003; Meyer *et al.*, 2004). Mittels SUT2-spezifischer Antikörper wird das SUT2/SUC3 Protein in Siebelementen des Phloems detektiert (Barker *et al.*, 2000). Elektronenmikroskopische Immunogold-Markierung zeigte, dass *SISUT2* in der Plasmamembran präsent ist (Barker *et al.*, 2000). Wie im Fall von SUT1 wurde auch für den SUT2 der mRNA- oder Protein-Makromolekültransport zwischen den Geleitzellen und den Siebelementen über Plasmodesmen postuliert (Barker *et al.*, 2000).

In Immunlokalisations-Experimenten wurde das *SISUT2* Protein im Pollen der Tomate, im wachsenden Pollenschlauch und in den Siebelementen der Früchte detektiert (Hackel *et al.*, 2006). Analyse der genomischen *SISUT2*-Promotorsequenz mit dem Web Signal Scan Programm bestätigten die Anwesenheit cis-regulatorischer Elemente, die für Pollen-spezifische Expression verantwortlich sind (He *et al.*, 2008).

Analyse des Phänotyps von transgenen Tomaten, die das *SISUT2* Gen in der antisense Orientierung konstitutiv exprimieren, zeigten Veränderungen, die Fruchtertrag und Fruchtentwicklung betrafen. Transgene Früchte besaßen weniger oder gar keine Samen und waren kleiner als die Wildtyp-Früchte. Biochemische Analysen haben einen verminderten Gehalt von löslichen Zuckern und Stärke in den jungen Früchten der Antisense *SISUT2* Tomaten nachgewiesen. Untersuchungen des Pollen-Keimungsprozesses zeigten eine Reduktion in der Pollenschlauchlänge sowie auch eine verringerte Pollenkeimungsrate der Antisense-Tomaten im Vergleich zur Kontrolle. Interessanterweise führte eine erhöhte Saccharosekonzentration, sowie ein verringerter pH im Keimungsmedium zu der Normalisierung der veränderten Parametern des Germinationsprozesses in den Antisense *SISUT2* Tomaten. Möglicherweise fungiert das SUT2 Protein als Saccharoetransporter und spielt eine Rolle bei der Zuckerbelieferung in die symplastisch isolierten Pollenstrukturen (Hackel *et al.*, 2006). Die Saccharoseaufnahmemessungen scheinen diese Theorie zu bestätigen (Hackel *et al.*, 2006). Die Saccharoseimportfunktion des SUT2 in *Arabidopsis* Sink-Organen wurden auch früher anhand der Detektion von *AtSUT2/AtSUC3*-Protein in verschiedenen pflanzlichen Strukturen wie Schließzellen, Trichomen, Pollen, Wurzelspitzen, Samenschale und Nebenblatt suggeriert (Meyer *et al.*, 2004)

Auch eine Rolle des SUT2 unter Stressbedingungen wird in Betracht gezogen. Dafür spricht z.B. die wund-induzierte Expression von *AtSUC3/AtSUT2* (Meyer *et al.*, 2004). Analyse der genomischen *SISUT2*-Sequenz mit dem Web Signal Scan Programm bestätigte die Anwesenheit der Verwundungs-induzierbaren cis-Elemente, sowie auch von Sequenzmotiven, die für die Antwort auf andere Umweltsignale wie Wasser- oder Salzstress verantwortlich sind (He *et al.*, 2008).



### 1.4.2 SUT4

*StSUT4* aus Kartoffeln, *SISUT4* aus Tomate und *AtSUT4* aus *Arabidopsis* wurden als erste Mitglieder der SUT4-Subfamilie kloniert (Weise *et al.*, 2000). Mitglieder der SUT4-Subfamilie weisen eine deutlich geringere Affinität zu Saccharose auf als SUT1. Der  $K_M$ -Wert liegt zwischen 5 mM und 6 mM. Ein Mitglied der SUT4 Subgruppe, *DcSUT1* aus *Daucus carota* ist mit einem  $K_M$ -Wert von 0,5 mM eine hochaffine Ausnahme in der Gruppe (Weise *et al.*, 2000; Weschke *et al.*, 2000; Kühn, 2003).

Es gab bislang kaum Nachweise über die physiologische Funktion der SUT4 Subfamilie. Die bisher in verschiedenen Pflanzen vorgenommenen Versuche, das Gen *SUT4* mit Hilfe eines Antisense-Konstruktes zu inhibieren, sind nicht gelungen (Frommer und Kühn, nicht publizierte Daten). Die aus publizierten Daten resultierenden unterschiedlichen SUT4-Lokalisierung-Vorschläge für verschiedene SUT4-Mitgliedern könnten auf artspezifische Unterschieden verweisen oder auf unterschiedliche Funktionen der SUT4-Orthologen in unterschiedlichen Pflanzen hinweisen.

#### Expression und Lokalisierung

Im Gegensatz zu SUT1 ist die Expression des *SUT4* schwach und die *SUT4*-mRNA, sowie auch das Protein sind durch Standardmethoden wie Western Blot oder Northern Blot kaum detektierbar (Weise *et al.*, 2000). Die Expression des GUS-Genproduktes unter Kontrolle des *AtSUT4* Promotors wurde im Gefäßsystem von *Sink*-Blättern, im Stempel und in Antheren detektiert. GUS-Protein wurde auch im Bereich der kleineren Blattadern von *Source*-Blättern nachgewiesen, was eine SUT4-Funktion bei der Phloembeladung nahelegt (Weise *et al.*, 2000).

Untersuchungen des *SISUT4* von Tomatenpflanzen, die mittels *RNase Protection Assay* (RPA) durchgeführt wurden, haben eine Organ-spezifische Expression des Gens gezeigt. Be-

sonders reich an *SUT4*-Transkripten waren *Sink*-Blätter und die Tomatenblüten und das höchste Niveau der *SUT4*-Expression wurde in den Ovarien und grünen Früchten festgestellt (Weise *et al.*, 2000). Die für die weiblichen Blüten-Organen spezifische *SUT4*-Transkriptakkumulation wurde auch mittels *real time* PCR bestätigt (Hackel *et al.*, 2006). Im Gegensatz zu der *AtSUT4*-Expression wurde das SUT4 Protein in Solanaceen nicht in kleinsten Blattadern, sondern in den Hauptadern von *Source*-Blättern und *Sink*-Blättern, sowie auch entlang des Transportphloems von Petiolen und Stängeln nachgewiesen (Weise *et al.*, 2000, Reinders *et al.*, 2002).

Eine Gewebe-spezifische Expression zeigte auch das homologe Gen aus *Lotus japonicus* *LjSUT4*. Die mit RT-PCR Techniken analysierte *LjSUT4*-Expression war am stärksten in Wurzeln und in Wurzelknöllchen und etwas schwächer in grünen Samenschalen und im Hypokotyl. Im Gegensatz zu Tomaten war die *SUT4*-Expression bei den *L. japonicus*-Pflanzen in solchen Organen wie Blättern, Blüten oder Stängel nicht nachweisbar (Flemetakis *et al.*, 2003). Für *LjSUT4* wurde aufgrund von RT-PCR und *in situ*-Hybridisierung eine Funktion in Saccharosetransportprozessen während der Wurzelknöllchen-Entwicklung postuliert (Flemetakis *et al.*, 2003).

Hefezellen, die *AtSUT4*, *HvSUT2* oder *StSUT4* exprimieren, sind zur <sup>14</sup>C-Saccharose-Aufnahme fähig, was eine Plasmamembran-Lokalisierung voraussetzt (Weise *et al.*, 2000; Weschke *et al.*, 2000). Hefezellen, die mit einem *SISUT4*-GFP Konstrukt transformiert wurden, zeigen GFP-Fluoreszenz an der Plasmamembran, sowie in einem perinukleären Ring (Chincinska *et al.*, 2008). Anhand von GFP-Fusionskonstrukten wurde dagegen für *SUT4*-Proteine aus *Arabidopsis* (*AtSUT4*), aus Gerste (*HvSUT2*) und aus *L. japonicus* (*SISUT4*) eine subzelluläre Lokalisierung im Tonoplast postuliert (Endler *et al.*, 2006; Reinders *et al.*, 2008). Auf eine mögliche Vakuolen-spezifische *LjSUT4*-Lokalisierung wiesen auch Proteom-Analysen hin (Reinders *et al.*, 2008). Jedoch im Fall von *AtSUT4* sprechen die Ergebnisse der Proteom-Untersuchungen dagegen für eine chloroplastidäre Lokalisierung des *SUT4* in *Arabidopsis* hin (Rolland *et al.*, 2003).

Mittels der Methode *two-phase partitioning*, die eine Separation der Endomembran-Fraktion ermöglichte, wurde über Western Blots mit StSUT4-spezifischen Antikörper eine bevorzugte Lokalisierung (Weise *et al.*, 2000) in der Plasmamembran gezeigt (Chincinska *et al.*, 2008). Die Plasmamembranlokalisierung wurde auch durch die Experimente mit StSUT4::GFP Konstrukten bestätigt, deren subzelluläre Lokalisierung mittels konfokaler Mikroskopie in transient transformierten Tabakprotoplasten, sowie in infiltrierten Tabak- und Kartoffelblättern beobachtet wurde. In Übereinstimmung mit früheren Daten von SISUT4-GFP exprimierenden Hefezellen wurde das GFP-Signal in der Plasmamembran und zusätzlich in einem perinukleären Ring beobachtet. Anhand der Ergebnisse wurde ein „duales *targeting*“ des SUT4 zur Plasmamembran und den Nukleus-umringenden Endomembranen postuliert (Chincinska *et al.*, 2008).

Mithilfe des Split Ubiquitin Systems wurde bisher die Interaktion zwischen SISUT4, SISUT1 und SISUT2 gezeigt (Reinders *et al.*, 2002). Die Interaktion zwischen SUT4 und anderen Saccharosetransportern wurde im pflanzlichen System noch nicht bestätigt. Jedoch mit Hilfe der Immunlokalisations-Methode wurden alle drei Proteine in Solanaceen in der Plasmamembran der Siebelementen des Phloems co-lokalisiert (Reinders *et al.*, 2002). Im Kontext der neusten Befunde, die auf eine wichtige regulatorische Bedeutung einer Redox-abhängigen SUT1-Homodimerisierung *in planta* hinweisen, kann man vermuten, dass auch Heterodimerisierung eine bedeutende Rolle für die Regulation der Funktion von Saccharosetransportern spielen kann (Krüegel *et al.*, 2008).

### **1.4.3 Regulation der *SUT2/SUT4* Saccharosetransporter**

Mitglieder der SUT2- und SUT4-Genfamilie scheinen grundsätzlich anderen Regulationsmechanismen zu unterliegen als Mitglieder der SUT1-Genfamilie. Mit *real time* PCR durchgeführte Analysen der *StSUT2/StSUT4*-Transkript-Stabilität nach Applikation von Transkriptions- und Translationsinhibitoren suggerieren post-transkriptionale Kontrolle der beiden Saccharosetransporter (He *et al.*, 2008).

Eine translationale Inhibition mittels Cycloheximid (CHX) verursacht einen Stabilisierungseffekt der *StSUT2/ StSUT4* Transkripte. Ein ähnlicher Stabilisierungseffekt nach der CHX-Behandlung ist auch im Fall von *AtSUT2/AtSUC3*-Transkripten bekannt (Arabidopsis Datenbank [http://csbdb.mpimgolm.mpg.de/csbdb/dbcor/ath/ath\\_txp.html](http://csbdb.mpimgolm.mpg.de/csbdb/dbcor/ath/ath_txp.html); He et al., 2008). Die mittels der Transkriptioninhibitoren Actinomycin D und Cordycepin festgestellte Halbwertszeit für die *SUT2* und *SUT4* Transkripte aus *Solanaceae* beträgt etwa 130 min. Die Halbwertszeit der *SUT2* und *SUT4* Transkripte wurde durch simultane Inhibierung von Transkription und Translation verlängert. Anhand der Experimente wurde postuliert, dass die Regulation der Akkumulation von *StSUT2*- und *StSUT4*-Transkripten von der *de novo* Biosynthese von negativ-wirkenden Regulatoren abhängig ist. Diese Regulatoren sind sehr instabile Proteine, da die signifikante Erhöhung des *StSUT2/ StSUT4* mRNA-Gehalts schon 2 Stunden nach der Behandlung mit dem translationalen Inhibitor CHX beobachtet wurde. Experimente mit dem Inhibitor des 26S Proteasoms MG132 haben gezeigt, dass diese kurzlebigen regulatorischen Proteine vermutlich ubiquitin-vermittelt abgebaut werden. Für den Abbau dieser kurzlebigen regulatorischen Proteine über den 26S Proteasomweg spricht die schnelle Destabilisierung der *StSUT2/ StSUT4*-Transkripte nach der MG132-Behandlung (He et al., 2008).

## 1.5 Die Rolle des Phloems bei der Integration von pflanzlichen Funktionen

Neben den Photoassimilaten findet im Phloem auch der Transport von anderen lebenswichtigen Stoffen, wie Aminosäuren, Proteinen und RNA-Molekülen, sowie auch Hormonen und manchen anorganischen Ionen zwischen entfernten Pflanzenorganen statt. Die im Phloemsaft transportierten Moleküle spielen nicht nur als Bau- und Nährstoffe eine Rolle, sondern einige sind auch essentiell für den Langstrecken-Transport von Signalen und für die Regulation physiologischer Prozesse in den Pflanzen (zur Übersicht: Kühn et al., 1997; Ruiz-Medrano et al., 1999; Xoconostle-Cázares et al., 1999; Yoo et al., 2004; Haywood et al., 2005; Lough und Lucas, 2006; Taiz und Zeiger, 2006; He et al., 2008). Das Langstreckentransport-System des Phloems ermöglicht der Pflanze also Transfer und Integration der in verschiedenen pflanzlichen Organen generierten Stimuli. Die Phloem-vermittelte Koordination der in entfernten Pflanzenteilen stattfindenden Prozesse ist essentiell für die Anpassung des pflanzlichen Organismus an veränderte Umweltbedingungen. Die Bedeutung der Phloem-vermittelten Kommu-

nikation zwischen unterschiedlichen Organen ist für die Regulation von physiologischen Prozessen wie Blühinduktion, Schattenvermeidungsreaktion oder, im Fall von Kartoffelpflanzen, die Induktion der Knollenbildung gut dokumentiert (Tooke und Battey, 2000, Ayre und Turgeon, 2004; Bernier und Périlleux, 2005; Lough und Lucas, 2006).

Es stellt sich die Frage, ob Saccharosetransporter, deren essentielle Bedeutung für die Phloemtransportfunktion gut dokumentiert ist, auch diese integrative Funktion des Phloems beeinflussen können. Auf diese Möglichkeit weisen die in der Vergangenheit beschriebenen Beobachtungen hin (Leggiewie, 1996) deswegen werden in folgenden Kapiteln kurz die wichtigsten Kontrollmechanismen dieser pflanzlichen Prozesse behandelt.

### **1.5.1 Blühinduktion**

Die Mechanismen der Blühinduktion sind in verschiedenen Pflanzenarten sehr universell (Bernier und Périlleux, 2005). Mittels Pfropfexperimenten zwischen unterschiedlichen Pflanzenarten wurde die Phloem-Mobilität des Blühstimulus und sein hoch universeller Charakter demonstriert (Mockler *et al.*, 2003; An *et al.*, 2004; Ayre and Turgeon, 2004; Searle und Coupland, 2004; Bernier und Périlleux, 2005; zur Übersicht Teiz und Zeiger; 2006). Eine essentielle Rolle für die Erkennung von Blüh-optimalen Umweltbedingungen und für die Generierung des Blühstimulus spielen die *Source*-Blätter (Lough und Lucas, 2006; Bernier und Périlleux, 2005).

Die Induktion der Blütenbildung ist in höheren Pflanzen durch ein integriertes Netz von unterschiedlichen genetischen Signaltransduktionswegen kontrolliert. Die Gene der verschiedenen Blühinduktionswege werden durch unterschiedliche endogene und exogene Faktoren (Inputsignale), wie Lichtqualität und Quantität, Hormone, ambiente Temperatur oder Zugang der Nährstoffe, reguliert (Bernier und Périlleux, 2005). In Arabidopsispflanzen, deren Blühinduktionsmechanismen gut verstanden sind, wurden 4 Haupt-Blühinduktionswege beschrieben: ein autonomer Blühinduktionsweg, sowie Wege, die entweder von der Photoperiode (Tageslänge), von Gibberellin oder der Vernalisation abhängig sind (Mouradow *et al.*, 2002). Als davon

getrennter Blühinduktionsweg wurde auch ein Saccharose-abhängiger Blühinduktionsweg vorgeschlagen (Bernier *et al.*, 1993; Bernier und Périlleux, 2005). Die Aktivierung von Genen der verschiedenen Blühinduktionswege führt zur Regulation von Blühintegrator-Genen. Blühintegratoren wirken *upstream* von Blütenmeristem-Identitätsgenen, die direkt an der Morphogenese des apikalen Sprossmeristems in das Blütenmeristem, also an der Überführung der Pflanzen von der vegetativen zur reproduktiven Wachstumsphase teilnehmen (Bernier und Périlleux, 2005; Lough und Lucas, 2006).

### Blühintegratoren

Die zwei wichtigsten Blühintegratoren sind: *FLOWERING LOCUS T (FT)* (Kobayashi *et al.*, 1999) und *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CO 1 (SOC1)*; auch als *AGAMOUS-LIKE 20 (AGL20)* bezeichnet (Kardailsky *et al.*, 1999), Das Gen *FT* kodiert ein kleines 23 kD, RAF-1-Kinase-Inhibitor-ähnliches Protein und das Gen *SOC1* kodiert ein MADS-Box-Transkriptionsfaktor (MCM1, AAGAMOUS, DEFICIENS, SRF) (Kobayashi *et al.*, 1999; Kardailsky *et al.*, 1999; Borner *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2000; Samach *et al.*, 2000; Parcy, 2005; Rodríguez-Falcón *et al.*, 2006).

*AtFT* ist hauptsächlich im Phloemgewebe von Kotyledonen und Blättern exprimiert (Takada und Goto, 2003; Yamaguchi *et al.*, 2005; Wigge *et al.*, 2005), während der FT-Protein-Wirkungsort sich im entfernten Gewebe des Sprossmeristems (SM) befindet. FT ist ein Phloem-mobiles Protein, welches vom Ort der Hauptexpression zum Wirkungsort wandert, um als Langstrecken-Signal die Blüte zu induzieren (An *et al.*, 2004; Corbesier *et al.*, 2007; Jaeger und Wigge, 2007; Mathieu *et al.*, 2007). Im SM kam es zur Verbindung des FT mit einem bZIP (*basic leucine zipper*) Transkriptionsfaktor, FD, und zur Bildung eines transkriptionellen FT/FD-Komplexes, das alternativ zum Blütenmeristem-Identitäts-Gen *LEAFY (LFY)* für die Aktivierung eines weiteren Blütenmeristem-Identitäts-Gens, dem MADS-Box Transkriptionsfaktor *APETALA1 (AP1)*, verantwortlich ist (Iris und Sussex, 1990; Weigel *et al.*, 1992; reviewed in Yanofsky, 1995; Abe *et al.*, 2005; Wigge *et al.*, 2005; Bernier und Périlleux, 2005; Searle *et al.*, 2006; Corbesier und Coupland, 2006; Turck *et al.*, 2008). Im SM kam es zur Bindung des FT-Proteins an einen bZIP (*basic leucine zipper*) Transkriptionsfaktor, FD, und zur Bildung eines transkriptionellen FT/FD-Komplexes, der für die Aktivie-

rung eines Blütenmeristem-Identitäts-Gens, dem MADS-Box Transkriptionsfaktor *APETALA1* (*API*) verantwortlich ist. Alternativ kann das *API* auch durch ein anderes Blütenmeristem-Identitäts-Gen und Blühintegrators *LEAFY* (*LFY*) aktiviert werden (Iris und Sussex, 1990; Weigel *et al.*, 1992; berichtet in Yanofsky, 1995; Abe *et al.*, 2005; Wigge *et al.*, 2005; Bernier und Périlleux, 2005; Searle *et al.*, 2006; Corbesier und Coupland, 2006; Turck *et al.*, 2008).

Bekannte FT-Orthologe aus verschiedenen Pflanzenarten beteiligen sich nicht nur an der Blühinduktion bei Langtag (LT)-Pflanzen, wie *Arabidopsis*, sondern haben einen mehr universellen Charakter. Z.B. ein FT-Ortholog, *HEADING DATE 3a* (*Hd3a*) ist für die Blühinduktion in Reis (*Oryza sativa*) essentiell, einer monokotylen Kurztag (KT)-Pflanze und *PhFT* ist für die Blühinduktion in der KT-Pflanze *Pharbitis nil* essentiell; dagegen ist *SINGLE FLOWER TRUSS* (*SFT*) an der Blühinduktion bei den tagneutralen Tomaten (autonomer Blühinduktionsweg) beteiligt (Kojima *et al.*, 2002; Molinero-Rosales *et al.*, 2004; Lifschitz *et al.*, 2006; Hayama *et al.*, 2007; Turck *et al.*, 2008).

*AtSOC1* ist im Sprossapex exprimiert, wo während der Blühtransition die *AtSOC1*-Expression stark ansteigt, sowie in Blättern und in Blattprimordien (Borner *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2000; Samach *et al.*, 2000; Parcy, 2005; Wigge *et al.*, 2005; Turck *et al.*, 2008). Die *soc1* Mutante blüht verspätet im Langtag (LT), sowie im Kurztag (KT) (Borner *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2000). Die Untersuchung von *soc1/ft*-Doppelmutanten zeigte, dass die Funktion dieser beiden Blühintegratoren teilweise überlappend ist. Die Expressionsanalysen zeigten, dass FT die *SOC1*-Expression und *SOC1* die *LFY*-Expression reguliert. Die gleichzeitige Mutation aller drei Gene: *FT*, *SOC1*, *LFY* reichte jedoch nicht aus, um das Blühen in *Arabidopsis* völlig zu unterdrücken (Iris und Sussex, 1990; Moon *et al.*, 2003; Yoo *et al.*, 2005; Searle *et al.*, 2006; Turck *et al.*, 2008). Die Expression von einem strikten *SOC1*-Homolog aus Reis, *OsSOC1*, wurde in vegetativen Geweben beobachtet. Die beschriebene Erhöhung der *OsSOC1*-Expression während der Blühinduktion, sowie das in *Arabidopsis*-Pflanzen mit konstitutiver *OsSOC1*-Expression beobachtete frühzeitige Blühen zeigt, dass die Funktion von *SOC1*-Homologen in verschiedenen Pflanzen vergleichbar ist (Tadege *et al.*, 2003).

## Photoperiodische Blühinduktion

Die Bedeutung des Langstreckentransportsystems des Phloems für die Blühinduktion wurde am besten bei den photoperiodisch abhängigen Pflanzen dokumentiert. Während die genetischen Kontrollmechanismen der photoperiodischen Blühinduktion in Arabidopsis gut verstanden wurden, weiss man kaum etwas über Blühinduktion in Kartoffelpflanzen. Arabidopsis ist eine fakultative LT-Pflanze, die viel früher im LT als im KT blüht, während das Blühen in verschiedenen Arten von Kartoffelpflanzen entweder LT-abhängig oder tagneutral sein kann (Almekinders und Struik, 1996; Macháčkowá *et al.*, 1998; Jackson *et al.*, 2000; Searle und Coupland, 2004; Bernier und Périlleux, 2005; González-Schain und Suárez-López, 2008).

## CONSTANS

Eine zentrale Rolle in der LT-Blühinduktion in Arabidopsis spielt das Gen *CONSTANS* (*CO*), das einen transkriptionalen Regulator kodiert, der zwei B-Box-Typ-Motive am N-Terminus und eine C-terminale CCT Domäne (CONSTANS, CONSTANS-LIKE, TIMING OF CAB EXPRESSION 1) enthält (Putterill *et al.*, 1995). Die *CO*mRNA wurde zwar in verschiedenen Geweben detektiert, jedoch wurde gezeigt, dass für die Blühinduktion die *CO*-Aktivität im vaskulären Gewebe des Blattes essentiell ist, während die *CO*-Expression im Apex neutral für die Blühinduktion zu sein scheint (Putterill *et al.*, 1995; Truernit and Sauer, 1995; Suarez-Lopez *et al.*, 2001; Takada und Goto, 2003; An *et al.*, 2004; Valverde *et al.*, 2004; Ayre und Turgeon, 2004; Kobayashi und Weigel, 2007). Das CONSTANS Protein selbst kann sich nicht aus den Geleitzellen bewegen. Es ist jedoch dafür bekannt, die beiden Blühintegratoren *FT* und *SOC1* positiv zu regulieren. Daher wurde für *CO* eine für die Regulation der Synthese und des Langstreckentransports des Blühinduktionssignals im vaskulären Gewebe wichtige Rolle postuliert (An *et al.*, 2004, Ayre and Turgeon, 2004).

Die *CO*-Expression unterliegt einer zirkadianen Regulation, die transkriptionale und posttranskriptionale Mechanismen involviert (Fowler *et al.*, 1999; Park *et al.*, 1999; Suarez-Lopez *et al.*, 2001; Yanovsky und Kay, 2002; Imaizumi *et al.*, 2003; David *et al.*, 2005; Imaizumi *et al.*, 2005; Valverde *et al.*, 2004; Sawa *et al.*, 2007; Turck *et al.*, 2008). *CO*-Protein akkumu-



liert nur im LT, am Ende der Lichtperiode, während es im Dunkeln Proteasom-abhängig abgebaut wird. In der post-transkriptionalen CO-Regulation spielen Photorezeptoren eine essentielle Rolle (Ahmad *et al.*, 1998; Guo *et al.*, 1998; Jarillo *et al.*, 2001; Suarez-Lopez *et al.*, 2001; Yanovsky and Kay, 2002; Gyula *et al.*, 2003; Mockler *et al.*, 2003; Valverde *et al.*, 2004; Laubinger *et al.*, 2004; Laubinger *et al.*, 2006; Turck *et al.*, 2008). Im LT ist das CO-Protein am Ende des Tages durch Photorezeptoren wie Phytochrom A (PHYA) und Cryptochrome (Cry) stabilisiert. Die beiden Photorezeptoren funktionieren teilweise überlappend bei der Verhinderung der Proteasom-abhängigen CO-Degradation (Valverde *et al.*, 2004). Phytochrom B (PHYB) dagegen vermittelt eine CO-Degradation am Anfang der Lichtperiode, was in CO-überexprimierenden transgenen Arabidopsispflanzen deutlich gezeigt wurde (Mockler *et al.*, 2003; Valverde *et al.*, 2004). Beobachtungen von *phyB* Reismutanten weisen auf inhibierende Wirkung von PhyB für die Blühinduktion auch in KT-Pflanzen hin (Ishikawa *et al.*, 2005; Kobayashi *et al.*, 2007).

#### Mögliche Zielgene von CONSTANS

Es wurde bisher nicht eindeutig geklärt, ob CO mehrere Targetgene aktivieren kann. Meistens wird neben *FT* auch *SOC1* als CO-Zielgen erwähnt (Samach *et al.*, 2000; Suarez-Lopez *et al.*, 2001; Yanovsky and Kay, 2002; An *et al.*, 2004; Parcy, 2005; Bernier und Périlleux, 2005; Turck *et al.*, 2008). Es wird jedoch auch in Betracht gezogen, dass FT das einzige direkte CO-Targetgen ist und SOC1 sehr früh durch FT aktiviert wird (Turck *et al.*, 2008).

Mutation von *FT* führt in den CO-überexprimierenden Pflanzen zur fast völligen Suppression des frühen Blühens in Arabidopsis (Yoo *et al.*, 2005). Die Überexpression von *FT*, sowie eine Phloem-spezifische oder auch SM-spezifische *FT*-Expression kompensiert den spätblühenden Phänotyp von *co*-Mutanten (Kardailsky *et al.*, 1999; Kobayashi *et al.*, 1999; An *et al.*, 2004). Zur CO-induzierten *FT*-Transkription in Arabidopsis kommt es nur im LT, wenn das AtCO-Protein in großen Mengen akkumuliert (Suarez-Lopez *et al.*, 2001; Kobayashi *et al.*, 2007; Turck *et al.*, 2008). Im Reis dagegen akkumuliert das Hd1-Protein, ein CO-Ortholog, sowohl im LT, als auch im KT. Zur Aktivierung eines *FT*-Orthologs, *Hd3a*, durch CO und zur Blühinduktion kommt es jedoch nur im KT. Im LT wirkt das Hd1 Protein als Hd3a-Repressor und

dieser Prozess wird durch PhyB positiv reguliert (Yano *et al.*, 2000; Kojima *et al.*, 2002; Kobayashi *et al.*, 2007; Turck *et al.*, 2008).

Mutation von *SOC1* führt nur zur teilweisen Suppression des frühblühenden *CO*-Überexpressions-Phänotyps (Yoo *et al.*, 2005). Unerklärt ist, in welchen Pflanzenteilen es zur Aktivierung von *SOC1* durch *CO* kommen kann. Es wurde zwar eine wesentliche Steigerung der *SOC1*-Aktivität während der Blühinduktion direkt im Apex beobachtet, jedoch wie schon erwähnt, war eine SM-spezifische Expression von *CO* für die Blühinduktion nicht ausreichend (Samach *et al.*, 2000; Takada und Goto, 2003; An *et al.*, 2004; Ayre und Turgeon 2004, Parcy, 2005). Ähnlich wie im Fall von *FT* wurde das Blatt als ein Aktivierungsort von *SOC1* durch *CO* vorgeschlagen. Sowohl die *SOC1*-Aktivierung, als auch der eventuelle Transportmechanismus eines *SOC1*-induzierten Signals zwischen Blatt und Apex erfordern jedoch noch gründlichere Untersuchungen für die vollständige Aufklärung (Parcy, 2005).

#### Die Rolle von Gibberellinen für die Blühinduktion

Als fakultative LT-Pflanze kann *Arabidopsis* auch im KT blühen. Die Blühinduktion unter nicht-induktiven KT-Bedingungen wird durch Gibberelline (GAs) begünstigt. Untersuchungen des Blühverhaltens nach exogener GA-Applikation, sowie Biosynthesemangelmutanten und Mutanten mit einer veränderten GA-Signaltransduktion zeigten, dass für die *Arabidopsis*-Blühinduktion unter nicht-induktiven KT-Bedingungen GAs erforderlich sind (Wilson *et al.*, 1992; Xu *et al.*, 1997; Reeves und Coupland, 2001; Bernier und Périlleux, 2005; Eriksson *et al.*, 2006). Es wurde beobachtet, dass GAs an der Induktion von *SOC1* and *LFY*, nicht aber der von *FT* beteiligt sind (Blázquez *et al.*, 1998; Borner *et al.*, 2000; Moon *et al.*, 2003; Blázquez und Weigel, 2000; Corbesier und Coupland 2006; Liu *et al.*, 2008).

Es wurde postuliert, dass GAs eine Komponente des Phloem-mobilen Blühinduktionssignals darstellen könnten, worauf die in *Arabidopsis* und in *Lolium temulentum* durchgeführten Beobachtungen hinweisen (King und Evans, 2003; Bernier und Périlleux, 2005; Eriksson *et al.*, 2006). Dank der Distribution der GA-Moleküle zwischen verschiedenen Pflanzenorganen

durch das Leitgewebe (vor allem dem Phloem) kann die GA-Aktivität lokal reguliert werden (Martínez-García *et al.*, 2002a; Fleet und Sun, 2005; zur Übersicht Teiz und Zeiger, 2006). Vermutlich werden GAs in Form biosynthetischer Zwischenstufen transportiert und erst an ihrem Zielorgan in die aktive GA-Form umgewandelt (Martínez-García *et al.*, 2002a; Rodríguez-Falcón *et al.*, 2006). Die Regulation der physiologischen Prozesse in pflanzlichen Organen kann auch auf einem Langstrecken-Transport der mRNAs von Genen beruhen, die an der GA-Signaltransduktion beteiligt sind (Haywood *et al.*, 2005).

In vielen Pflanzenarten wirken GAs ähnlich wie in *Arabidopsis* positiv auf das Blühverhalten (Wilson *et al.*, 1992; Xu *et al.*, 1997; Reeves und Coupland, 2001; Bernier und Périlleux, 2005; Eriksson *et al.*, 2006). Es sind jedoch auch Fälle bekannt, in denen Gibberelline einen negativen Effekt auf die Blühinduktion aufweisen. Bei tagneutralen Tomaten oder bei KT-abhängigen *Fuchsia hybrida* wurde eine inhibierende Wirkung von GAs auf die Blühinduktion beobachtet (King und Ben-Tal, 2001; Dielen *et al.*, 2001).

Am GA-abhängigen Blühinduktionsweg sind Gene der GA-Biosynthese oder der GA-Signaltransduktion beteiligt (Koornneef *et al.*, 1985; Wilson *et al.*, 1992; Blázquez *et al.*, 1998; Bernier und Périlleux, 2005). Außer Veränderungen des Blühverhaltens zeigen Pflanzen mit veränderter GA-Biosynthese oder GA-Signaling auch Modifikationen vegetativer Organe. *gal*-*Arabidopsis*-Mutanten, in denen die GA-Biosynthese gestört ist, sowie GA-insensitive *gai*-Mutanten weisen Zwerg-Wuchs, verkürzte Internodien und Petiolen, sowie vermehrt dunkelgrüne Blätter auf (Koornneef *et al.*, 1985; Wilson *et al.*, 1992; Blázquez *et al.*, 1998).

In *Arabidopsis* und Reis wurde der GA-Signaling-Mechanismus unter Vermittlung eines GA-Rezeptors (GID1) aufgeklärt. Die GA-Bindung an den GID1-Rezeptor führt zur Bildung eines Komplexes mit einem DELLA-Repressor. DELLA-Transkriptionsfaktoren gehören zu der für Pflanzen spezifischen GRAS Proteinfamilie (GAI, RGA, SCARECROW) (Ueguchi-Tanaka *et al.*, 2005; Nakajima *et al.*, 2006; Vandenbussche *et al.*, 2007). In Anwesenheit von GA kommt es zum Proteasom-abhängigen DELLA-Abbau, was für die Induktion von verschiede-

nen GA-kontrollierten physiologischen Prozessen erforderlich ist (Dill und Sun, 2001; Silverstone *et al.*, 2001; McGinnis *et al.*, 2003; Sasaki *et al.*, 2003; Alvey und Harberd, 2005; Ueguchi-Tanaka *et al.*, 2005; Nakajima *et al.*, 2006; Willige *et al.*, 2007; Djakovic-Petrovic *et al.*, 2007; zur Übersicht Vandenbussche *et al.*, 2007). Die Genom-Analysen von verschiedenen Pflanzenarten zeigten, dass der bei Arabidopsis und Reis beschreibende GA-Signalweg unter Gefäßpflanzen hoch konserviert ist (Vandenbussche *et al.*, 2007).

### **1.5.2 Induktion der Knollenbildung**

Pfropfungsexperimente zwischen Solanaceen-Pflanzenarten haben gezeigt, dass ein in *Source*-Blättern von Tabakpflanzen generierter, Phloem-mobiler Blühstimulus fähig ist, unter nicht-induktiven Bedingungen die Knollenbildung in einer Kartoffel-Propfunterlage zu induzieren (Jackson, 1999; Rodríguez-Falcón *et al.*, 2006; Lough und Lucas, 2006). Es wurde daher vorgeschlagen, dass an der Blühinduktion, sowie an der Induktion der Knollenbildung ähnliche Kontrollmechanismen beteiligt sind (Jackson, 1999; Martínez-García *et al.*, 2002b; Rodríguez-Falcón *et al.*, 2006; Lough und Lucas, 2006; González-Schain und Suárez-López, 2008).

Anhand von Kartoffelpflanzen mit veränderter Knollenbildung wurden zwei Haupt-Kontrollwege der Knollen-Induktion vorgeschlagen: der photoperiodisch gesteuerte Weg und GA-abhängige Weg (Jackson, 1999; Rodríguez-Falcón *et al.*, 2006).

#### Regulation durch die Photoperiode

Hinsichtlich der Knollenbildung gehört *Solanum tuberosum* ssp. Désirée zu den fakultativen KT-Pflanzen (Schittenhelm *et al.*, 2004). Dagegen sind viele Sorten von *Solanum tuberosum* ssp. *andigena*, auch die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Linien, ausschließlich unter KT-Bedingungen in der Lage Knollen zu bilden (obligate KT-Pflanzen) (Jackson, 1999; Martínez-García *et al.*, 2002b; Rodríguez-Falcón *et al.*, 2006; Chincinska *et al.*, 2008).

Zur Erklärung des Mechanismus der von der Tageslänge abhängigen Knolleninduktion im KT wurde ein Modell vorgeschlagen, das analog dem Mechanismus der Blühinduktion in der KT-Pflanze Reis funktioniert (Abbildung im Anhang) (Rodríguez-Falcón *et al.*, 2006). Nach diesem Modell soll ein CO/Hd1-Ortholog aus Kartoffel die Transkription des *FT/Hd3a*-Orthologs unter KT-Bedingungen induzieren und unter LT-Bedingungen PhyB-abhängig reprimieren (Hayama und Coupland, 2004; Ishikawa *et al.*, 2005; Kobayashi *et al.*, 2007; Rodríguez-Falcón *et al.*, 2006). Für dieses Modell sprechen die Beobachtungen von transgenen Kartoffeln mit einer heterologen *AtCO*-Überexpression, die unter induktiven-KT-Bedingungen eine stark verspätete Knollenbildungsinduktion zeigten (Martínez-García *et al.*, 2002b). Eine Rolle in der Regulation der Knollenbildungsinduktion wurde auch für den Kartoffelorthologen der beiden CO-Targetgene: *FT* und *SOCl*, postuliert (Kobayashi *et al.*, 1999; Kardailsky *et al.*, 1999; Rodríguez-Falcón *et al.*, 2006).

Ähnlich wie bei der photoperiodischen Blühinduktion sind die *Source*-Blätter der Ort der Signalperzeption. Es wurde postuliert, dass an der Generierung eines Knollen induzierenden Signals verschiedene Photorezeptoren teilnehmen. Am besten wurde dabei die Beteiligung von PHYB untersucht. *PhyB*-Antisense-Andigenapflanzen waren sowohl im KT, als auch unter nicht-induktiven LT-Bedignungen zur Knollenherstellung fähig. Pfropfexperimente zeigten, dass Antisense-*PhyB* Unterlagen im LT nicht mehr zur Knollenbildung fähig waren, wenn ein WT-Reis aufgepfropft wurde. Es wird daher vermutet, dass PhyB in Kartoffeln für die Inhibierung der Knollenbildung unter LT-Bedingungen verantwortlich ist (Jackson *et al.*, 1996; Jackson *et al.*, 1998). Neben PhyB wurde in Kartoffeln auch ein zweites Phytochrom, PhyA, näher charakterisiert (Heyer und Gatz, 1992a; Heyer und Gatz, 1992b). *PhyA* Überexpression verursacht bei Kartoffeln eine verspätete Knollenbildung, ein verringertes Wachstum und erhöhte Akkumulation von Anthocyanen und Chlorophyllen. Die Reduktion der *PhyA*-Expression verursachte einen gegensätzlichen Phänotyp. (Yanovsky *et al.*, 1998; Yanovsky *et al.*, 2000). Es wurde postuliert, dass die beobachteten Effekte durch Deregulierung der pflanzlichen inneren Uhr infolge veränderter *PhyA*-Expression verursacht wurden (Yanovsky *et al.*, 2000).

## Gibberellin-abhängige Knolleninduktion

An der Knolleninduktion direkt im Stolon nehmen verschiedene Hormone teil: Gibberelline, Cytokinine, Jasmonsäure und Tuberonsäure, sowie Abscisinsäure (zur Übersicht: Xu *et al.*, 1998; Jackson, 1999; Rodríguez-Falcón *et al.*, 2006). Meistens wirken diese Hormone jedoch nur direkt im Stolon, wo sie für die Kontrolle der Knollenentwicklung verantwortlich sind, während die Gibberelline eine duale Funktion zu erfüllen scheinen. Wahrscheinlich sind die GAs nicht nur an der Knollenentwicklung beteiligt, sondern auch für die Produktion eines mobilen Stimulus in Blättern wichtig, der die Knollenbildung induziert (Rodríguez-Falcón *et al.*, 2006).

Die Knolleninduktion ist mit einer starken Reduktion des endogenen GAs-Gehalts, vor allem der 3 $\beta$ -hydroxylierten GA<sub>1</sub>, korreliert (Macháčková *et al.*, 1998; Martínez-García *et al.*, 2002a; Rodríguez-Falcón *et al.*, 2006). Ein erhöhtes GA-Niveau inhibiert dagegen die Knollenherstellung (Jackson, 1999). Die Andigena-Zwergmutante *gal*, die eine Störung des 13-Hydroxylierungsschrittes der GA-Biosynthese aufweist, stellen sogar unter nicht-induktiven LT-Bedingungen Knollen her (jedoch viel später als im KT) (Van den Berg *et al.*, 1995; Jackson, 1999; Rodríguez -Falcón *et al.*, 2006). Eine Beschleunigung der Knollenherstellung im LT ist durch Behandlung der Kartoffelpflanzen mit GA-Biosyntheseinhibitoren wie Paclobutrazol oder Ancymidol möglich (Jackson und Prat, 1996; Jackson, 1999; Rodríguez -Falcón *et al.*, 2006). Dagegen zeigen GA-insensitive *gai-1* Andigena-Mutanten mit einer erhöhten Stabilität des DELLA-Repressors GAI eine frühzeitige Knollenbildung im KT, sind jedoch unter LT-Bedingungen nicht zur Knollenbildung fähig. Dies deutet auf die Beteiligung eines zusätzlichen, durch GA positiv regulierten Stimulus der Knollenbildung unter LT-Bedingungen (Rodríguez -Falcón *et al.* 2006).

Für die Regulation des Levels bioaktiver GAs spielen die Enzyme des letzten Biosyntheseschritts (cytoplasmatische Etappe) eine essentielle Rolle, insbesondere GA20-Oxidase (GA20ox), GA3-Oxidase (GA3ox) und das Enzym GA2-Oxidase (GA2ox), das für GA-Deaktivierung verantwortlich ist (zur Übersicht: Schopfer und Brennicke, 1999; Martínez-García *et al.*, 2002a; Teiz und Zeiger, 2006). Während die GA20ox und GA3ox kodierenden Gene meistens durch aktive GAs negativ reguliert werden, wurde zwischen den GA2ox Ge-

nen und GAs ein positiver *feedback* Regulationsmechanismus festgestellt (Carrera *et al.*, 1999; berichtet in: Teiz und Zeiger, 2006). Überexpression eines *GA20ox* Gens verursachte eine verspätete Knolleninduktion im KT, dagegen kam es bei Pflanzen mit verringerter *GA20ox*-Aktivität zur früheren Knolleninduktion im KT (Carrera *et al.*, 2000). Kürzlich wurde gezeigt, dass in der apikalen Stolonzone  $GA_1$  durch *GA2ox1* lokal reguliert wird und dass die *GA2ox1*-vermittelte  $GA_1$ -Degradation für die Knollenbildungsinduktion essentiell sein kann (Kloosterman *et al.*, 2007). Nach einer Theorie entsteht GA in *Source*-Blättern in der inaktiven Form  $GA_{20}$ , die über lange Strecken transportiert werden kann und erst in den Zielorganen z.B. in Stolonen zur aktiven  $GA_1$  metabolisiert wird (Martínez-García *et al.* 2002a).

### 1.5.3 Schattenvermeidungsreaktion

Veränderungen in der Knollenbildung können auch im Rahmen der pflanzlichen Antwort auf Beschattung, der sog. Schattenvermeidungsreaktion entstehen. Beschattung inhibiert die Knollenproduktion (Jackson, 1999). Die Schattenvermeidungsreaktion umfasst auch eine erhöhte Internodienelongation und Verstärkung der apikalen Dominanz, sowie Reduktion des Flächenwachstums der Blätter. Im Schatten steigt die Konzentration des gesamten Chlorophylls in Blättern, aber das Verhältnis von Chlorophyll A zu Chlorophyll B sinkt und es kommt außerdem zum Absinken des Karotinoid-Gehalts. Beschattung beschleunigt meistens auch das Erblühen, sowie die Alterung von Pflanzen (zur Übersicht: Ballaré, 1999; Rousseaux *et al.*, 1997; Schopfer und Brennicke, 1999; Cerdan und Chory, 2003; Kozuka *et al.*, 2005; Vandenbussche *et al.*, 2005; Franklin und Whitelam, 2005; Taiz und Zeiger, 2006).

Bei der Anpassung der pflanzlichen Physiologie an veränderte Lichtqualität sind verschiedene genetische Signalübertragungswege beteiligt. Die Beteiligung von Elementen der zirkadianen Uhr, der Photoperiode, sowie von Phytohormonen an der Generierung von Schattenvermeidungsreaktionen wurde postuliert. Die Mechanismen der Interaktion zwischen diesen unterschiedlichen Signalübertragungswegen der Schattenvermeidungsreaktion wurden jedoch nicht vollständig geklärt (Gyula *et al.*, 2003; Vandenbussche *et al.*, 2005; Jiao *et al.*, 2007; Franklin und Whitealm, 2005; Johnson *et al.*, 2008).

Schattenvermeidungsreaktion ist vor allem durch ein erniedrigtes HR:DR-Verhältnis und in einem geringeren Ausmaß auch durch die reduzierte Blaulicht-Intensität ausgelöst (Ballaré, 1999; Franklin und Whitelam, 2005; Pierik *et al.*, 2004b; Vandenbussche *et al.*, 2005; Djakovic-Petrovic *et al.*, 2007), demnach könnten theoretisch alle bekannten pflanzlichen Licht-Rezeptoren an der Generierung der Schattenvermeidungsreaktion beteiligt sein (Gyula *et al.*, 2003; Vandenbussche *et al.*, 2005; Jiao *et al.*, 2007; Franklin und Whitealm, 2005). Besondere Rolle bei der Aufnahme der Veränderungen des HR:DR-Verhältnisses und der Regulation der Schattenvermeidungsreaktion wurde dem PHYB zugeschrieben (Smith und Whitelam, 1997; Bernier und Périlleux, 2005; Franklin und Whitelam, 2005; Vandenbussche *et al.*, 2005). *phyB*-defiziente Mutanten zeigen eine konstante Antwort auf die Beschattung, also verlängerte Sprosse und Petiolen, reduzierte Blattflächen, niedrigeren Chlorophyllgehalt und frühes Erblühen (Reed *et al.*, 1993; Mockler *et al.*, 2003; Franklin und Whitelam, 2005). Auch PHYA hat Bedeutung für die Entstehung von Schattenvermeidungsreaktionen. PHYA spielt in Kartoffeln eine essentielle Rolle in der Anpassung an den pflanzlichen Tagesrhythmus im Vorlauf der Photoperiode (Yanovsky *et al.*, 2000). Weder Pflanzen, die *PhyA* überexprimieren noch die Pflanzen mit reduzierter *PhyA*-Expression waren fähig, die Veränderungen der HR:DR-Verhältnisses zu erkennen (Yanovsky *et al.*, 1998; Yanovsky *et al.*, 2000).

Analyse der globalen Genexpressionsänderungen in *phyB*-Mutanten, in *phyAphyB*- Doppelmutanten, sowie in WT-Keimlingen von Arabidopsis zeigten, dass viele der Gene, die durch Beschattung induziert werden, bekanntermassen durch Hormone und Licht reguliert werden. Die Mehrheit dieser Genen unterliegt im Schatten einer antagonistischen Regulation durch *phyA* und *phyB* (Devlin *et al.*, 2003).

Infolge der Exposition von Pflanzen mit Licht, das einen erhöhten Dunkelrot-Anteil besitzt, kommt es bei Arabidopsis zur positiven *FT*-Regulation und zum frühzeitigen Blühen (Cerdán und Chory, 2003; Devlin *et al.*, 2003; Endo *et al.*, 2005; Johnson *et al.*, 2008). Bei Arabidopsis kommt es nur im LT durch ein niedriges HR:DR-Verhältnis zu frühzeitigem Blühen, nicht jedoch im KT (Johnson *et al.*, 2008). Daher wurde postuliert, dass das niedrige HR:DR-Verhältnis das photoperiodische Signal in Pflanzen verstärken kann (Devlin *et al.*, 2003; Valverde *et al.*, 2004). Erhöhte Transkriptlevel von photoperiodischen Blühinduktionsgenen wie *GI*, *CO* und *FT*, die bei verringertem HR:DR-Verhältnis beobachtet wurden, scheinen diese



Theorie zu bestätigen. Interessanterweise wurde in *phyB*-Mutanten vermehrt CO-Protein nachgewiesen. Es wurde auch eine mögliche Beteiligung von *SOCI* an dem durch niedriges HR:DR-Verhältnis induzierten Blühen in Betracht gezogen (Johnson *et al.*, 2008).

Eine wichtige Rolle bei der Regulation der Schattenvermeidungsreaktion spielen Hormone, insbesondere Gibberelline und Ethylen (Vandenbussche *et al.*, 2005). Dabei ist die Ethylen-Antwort von GA abhängig (Pierik *et al.*, 2004a; Vandenbussche *et al.*, 2005). In *Arabidopsis* Mutanten, die entweder Ethylen-insensitiv oder im GA-Signalweg gestört sind, aber auch bei WT-Pflanzen nach Behandlung mit GA-Biosyntheseinhibitoren, wurde eine verringerte Reaktion auf ein erniedrigtes HR:DR-Verhältnis beobachtet (Peng und Harberd, 1997; Pierik *et al.*, 2004b; Vandenbussche *et al.*, 2005). In *phyB*-Mutanten, die eine konstante Schattenvermeidungsreaktion zeigen, wurde dagegen ein erhöhter Gehalt von aktiven GAs festgestellt (Vandenbussche *et al.*, 2005; Rodríguez-Falcón *et al.*, 2005). Inaktivierung der aktiven GA-Form kann den *phyB*-Phänotyp aufheben (Peng und Harberd, 1997; berichtet in Vandenbussche *et al.*, 2005). Es wurde gezeigt, dass die DELLA-Proteine, die als Elemente des GA-Signalübertragungsweges bekannt sind, eine essentielle Rolle für die Integration von verschiedenen Signalen spielen können, die die physiologische Antwort der Pflanzen auf Beschattung regulieren (Achard *et al.*, 2007; Djakovic-Petrovic *et al.*, 2007). Es wurde unter anderem gezeigt, dass DELLA-Aktivität auch durch andere Phytohormone, sowie durch Phytochrome und Cryptochrome reguliert werden kann (Vandenbussche *et al.*, 2005; Achard *et al.*, 2007; Djakovic-Petrovic *et al.*, 2007).

#### **1.5.4 Saccharose als Signalmolekül**

Im pflanzlichen Organismus spielt die Saccharose nicht nur als Photoassimilat-Transportform, sondern auch als ein wichtiges Signalmolekül eine bedeutende Rolle. Es wurde schon vor langem postuliert, dass Saccharose eine Komponente des Blühinduktions- sowie Knolleninduktions-Signalkomplexes darstellt. Wird ein Ansteigen der Saccharosekonzentration verhindert, so kommt es zum verspäteten Blühen (Corbesier *et al.*, 1998; Bernier und Périlleux, 2005; Eriksson *et al.*, 2006). Die Bedeutung des Saccharose-Signalings für die Blühinduktion wurde eindeutig im Fall der obligaten LT-Pflanze *Synapis alba* nachgewiesen (Havelange *et*

*al.*, 2001; Bernier und Périlleux, 2005). Auch in *Arabidopsis*, wurde der Anstieg der Saccharosekonzentration in dem aus Blättern exportierten Phloemsaft kurz bevor und während der Blühinduktion beobachtet. Mit dem Saccharosekonzentrations-Anstieg ging ein paralleler Anstieg der Gibberellin A<sub>4</sub> einher, die in *Arabidopsis* für Regulation der Sprosselongation und Blühinduktion verantwortlich ist. Eine synergistische Interaktion zwischen Saccharose und GA<sub>4</sub> für die Induktion des Blütenmeristem-Identitäts-Gens *LFY* wurde postuliert (Blázquez *et al.*, 1998; Eriksson *et al.*, 2006).

Die Saccharoseapplikation auf oberirdische Organe, vor allem dem SM, der *in vitro* und in manchen Fällen auch der *in vivo* angezogenen *Arabidopsis*-Blühzeitmutanten wie *co* oder *phyA* Mutanten, sowie *fca* (Mutation eines Gens des autonomen Blühinduktionswegs) oder *gi*, (Mutation des *GIGANTEA*; des Gens des photoperiodisch gesteuerten Wegs) kann den spätblühenden Phänotyp teilweise komplementieren. Dagegen war Saccharose nicht fähig die spätblühende *ft* Mutante zu komplementieren, was auf eine Saccharose-Wirkung *upstream* von *FT* hinweist (Roldán *et al.*, 1999; Bernier und Périlleux, 2005). Es wurde gezeigt, dass der Effekt der Blühinduktion stark von der Saccharosekonzentration abhängig ist. Eine hohe Saccharosekonzentration (5%) im Wachstumsmedium inhibiert die Blühinduktion beim WT, sowie bei spätblühenden *Arabidopsis* Mutanten (Otto *et al.*, 2001).

Auf die stimulierende Saccharosewirkung für die Blühinduktion weist auch der während des Blühens bei der Modell-KT-Pflanze *Xanthium strumarium* beobachtete transiente Anstieg des Saccharoseexports aus Blättern hin (Houssa *et al.*, 1991). Nicht nur bei photoperiodisch regulierten Pflanzen, sondern auch bei Tomaten, deren Blühinduktion von exogenen Umweltfaktoren unabhängig ist (autonome Blühinduktion), wurde eine stimulierende Wirkung der Saccharose für den Blühzeitpunkt beschrieben (Dielen *et al.*, 2002).

Saccharose kann auch den Prozess der Knollenbildung beeinflussen (Jackson, 1999). Erhöhung der Saccharosekonzentration im Stolon durch Antisense-Inhibition eines Schlüsselenzyms für die Stärkesynthese, der ADP-Glukose Pyrophosphorylase (AGPase) in Knollen verursacht eine verstärkte Knollen-Produktion (Müller-Rober *et al.*, 1992; Jackson, 1999). Die Saccharose ist auch für die *in vitro* Knollenherstellung erforderlich. Die höchste Mikroknol-

len-Produktion wurde bei einer hohen Saccharosekonzentration (8%) im Induktionsmedium erreicht (Xu *et al.*, 1998a). Die Untersuchungen des GA<sub>1</sub>-Niveaus in *in vitro* Stolonen haben einen negativen Effekt ansteigender Saccharosekonzentrationen auf die endogenen GAs gezeigt (Xu *et al.*, 1998a).

Die oben beschriebenen Effekte suggerieren, dass Saccharose sowohl eine hormonelle Antwort (unter anderem GA-Antwort), sowie den von der Photoperiode kontrollierten Signalweg modifizieren kann. Diese These bestätigen Untersuchungen von bekannten Saccharose-Signalingmutanten, sowie von transgenen Pflanzen mit einem veränderten Zucker-Metabolismus (Corbesier *et al.*, 1998; Gibson *et al.*, 2001; Gibson, 2004; Bernier und Périlleux, 2005; Kozuka *et al.*, 2005; Eriksson *et al.*, 2006; Bernier und Périlleux, 2005). *sis1* (*sucrose insensitive 1*) Arabidopsis-Mutanten sind allelisch zu den *ctr1-1* (*constitutive triple response*) Mutanten, die wegen Mutation eines Ethylen-Repressors, CTR1, eine konstitutive Ethylen-Antwort aufweisen (Achard *et al.*, 2003). Die *sis1* Pflanzen wurden anhand einer erhöhten Resistenz auf die Saccharose-abhängige Hemmung der Keimlings-Entwicklung isoliert. Für *sis1/ctr1-1* ist ein kompakter Rosetten-Phänotyp und verkürzte Wurzeln charakteristisch. Die *sis1/ctr1-1* Mutanten waren auch fähig, auf Paclobutrazol-haltigem Medium zu keimen (Gibson *et al.*, 2001). Die Entstehung des *sis1/ctr1-1* Phänotyps beruht auf Inhibition der Ethylen-vermittelten Hemmung der GA-abhängigen Degradation von DELLA-Proteinen: GAI und RGA (Achard *et al.*, 2003).

Auf die Bedeutung vom DELLA-Protein GAI bei der Integration des Saccharose-Signalwegs und Phytohormon-Signalwegen weisen auch die Daten, die die Regulation der Anthocyan-Biosynthese betreffen. Es wurde unter anderem gezeigt, dass die Enzyme des Anthocyan-Biosynthesewegs durch Saccharose induziert werden und diese Induktion stark durch GA reprimierbar ist (Solfanelli *et al.* 2006; Loreti *et al.* 2008). *gai*-Mutanten sind auf die GA-vermittelte Repression des Enzyms des Anthocyan-Biosynthesewegs Dihydroflavonal Reduktase weniger empfindlich. GAI könnte demnach an der Integration des Saccharose-Signalwegs und der GA-Antwort beteiligt sein (Loreti *et al.* 2008). Kürzlich wurde gezeigt, dass der Saccharosetransporter AtSUC1 eine Rolle in der Saccharose-induzierten Anthocyan-Biosynthese spielt. Arabidopsis *suc1* Mutanten akkumulierten weniger Anthocyane als Reaktion auf exogene Saccharose-Behandlung als der WT (Sivitz *et al.*, 2008).

Es wurde auch gezeigt, dass Saccharose die pflanzliche Antwort auf die Lichtbedingungen modifizieren kann (Kozuka *et al.*, 2005; Dijkwel *et al.*, 2007). Während z.B. WT Arabidopsis-Keimlinge auf DR-Licht mit Inhibition der Hypokotyl-Verlängerung und Öffnung der Kotyledonen reagieren, weist die *sun (sucrose-uncoupled)*-Mutante mit reduzierter Saccharosesensitivität eine reduzierte DR-Antwort auf (Dijkwel *et al.*, 2007). In einem anderen Beispiel wurde gezeigt, dass Saccharose das Blattflächenwachstum abhängig von der Lichtqualität modifizieren kann (Kozuka *et al.*, 2005).

## 2 Ziele der Arbeit

Im ersten Teil der Arbeit soll das *SUT4*-Expressionsmuster in Wildtyp Kartoffelpflanzen der Varietät Désirée untersucht werden. Die Analyse der gewebespezifischen, sowie zeitabhängigen *StSUT4*-Expression und der Vergleich des *StSUT4*-Expressionsmusters mit den beiden anderen Saccharosetransportern, *StSUT1* und *StSUT2*, soll einen Überblick auf mögliche Unterschiede in der Funktion und der Bedeutung, sowie der Regulation der verschiedenen Saccharosetransporter in Kartoffeln ermöglichen. Dies sollte unter Verwendung einer sehr sensitiven quantitativen Methode, der *real time* PCR (qPCR), geschehen. Die Eignung und Zuverlässigkeit der qPCR für die Genexpressionsanalyse soll dabei ebenfalls untersucht werden. Dazu werden die mittels qPCR gewonnenen Ergebnisse mit bekannten Daten verglichen, die mit Hilfe anderer Methoden der Expressionsanalyse gewonnen wurden.

In einem weiteren Teil wird die Herstellung und Untersuchung transformierter Kartoffeln und Tomaten mit einer dank RNAi-Interferenz-Technik reduzierten *SUT4*-Expression angestrebt. Die Analyse der *SUT4*-RNAi Pflanzen soll weitere Einblicke in die *SUT4*-Funktion ermöglichen. Die Bestimmung des Zuckergehalts in *Sink*- und *Source*-Organen, sowie des Phloemeffluxes in den *StSUT4*-RNAi Pflanzen soll die Effizienz des Saccharosetransports aufklären. Die Frage ist, ob *SUT4* direkt am Saccharosetransport beteiligt ist.

Die Effekte der *SUT4*-Inhibierung erinnern an Mutanten, in denen Wachstum, Blühverhalten und Knolleninduktion gestört sind. Daher sollen weitere Untersuchungen eine mögliche Interaktion des *SUT4* mit verschiedenen metabolischen Wegen, insbesondere dem Gibberellin-Signal- und –Biosyntheseweg, sowie dem photoperiodischen Signalweg aufklären. Dabei ist die Rolle des Kohlenhydratprofils in den *StSUT4*-RNAi-Pflanzen für den Verlauf der hormonell und photoperiodisch kontrollierten Prozesse von großer Bedeutung.

Weitere Analysen sollen *StSUT4*-RNAi Kartoffelpflanzen Subspezies *Andigena* betreffen. Diese Unterart ist streng photoperiodisch kontrolliert. Sowohl der Phänotyp, als auch das Blühverhalten, das Wachstum und die Knollenbildung der *Andigena*-Pflanzen sollen mit denjenigen der *StSUT4*-RNAi Kartoffelpflanzen der Varietät *Désirée* verglichen werden. Diese Experimente sollen die in den *StSUT4*-RNAi Kartoffelpflanzen Varietät *Désirée* beobachtete SUT4-Interaktion mit dem photoperiodischen, sowie dem Gibberellin-gesteuerten Signalwegen bestätigen.

Die während der Arbeit gewonnenen Ergebnisse sollen einen Einblick in die physiologische Bedeutung des SUT4 in Solanaceen gewähren. Sie sollen auch die Richtung zukünftiger Experimente vorgeben, die detailliert die molekularen Mechanismen der SUT4-Wirkung im pflanzlichen Organismus aufklären sollen.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Chemikalien und Reagenzien

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Laborchemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien, Synthetische Oligonukleotide im analytischen Reinheitsgrad von den Firmen: Amersham Pharmacia (Braunschweig), Applichem (Darmstadt), Appligene (Heidelberg), Biomol (Hamburg), Boehringer (Mannheim), Bio-Rad (München), Calbiochem (San Diego, USA), Difco (Detroit, USA), Duchefa (Haarlem, Niederlande), Fermentas (St. Leon-Rot), Fluka (Buchs, Schweiz), GibcoBRL (Eggenstein), New England Biolabs (Frankfurt), Merck (Darmstadt), Promega (Madison, USA), Qiagen (Hilden), Roche Diagnostics (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Stratagene (Amsterdam, Niederlande), Sigma Aldrich (Steinheim) und Whatman (Maidstone, England) bezogen.

### 3.2 Pflanzenmaterial

Als pflanzliche Modellorganismen wurden Solanaceen verwendet. Meistens wurden die Untersuchungen an *Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum* L. Varietät Désirée, die eine fakultativ photoperiodische Pflanze ist, durchgeführt. Die wichtigsten Experimente wurden mit den obligatorisch photoperiodisch abhängigen Kartoffelpflanzen *Solanum tuberosum* ssp. *andigena* (Andigena) wiederholt. Für die Untersuchungen wurden Wildtyp-Kartoffel, sowie auch Transformanten mit reduzierter *SUT4* Expression von beiden Kartoffelarten angewendet.

Die Analysen der Fruchtentwicklung und Fruchtmorphologie infolge der *SUT4*-Inhibition wurden mit Hilfe von transgenen *StSUT4*-RNAi Tomatenpflanzen *Solanum lycopersicum*

*cultivar* „Moneymaker“ durchgeführt. Vergleichende Wildtyp Tomatenpflanzen wurden als Kontrolle verwendet.

Manche Versuchen wurden mit Spmyc Tabakpflanzen von *Nicotiana tabacum* L. Varietät Samsun mit Überexpression von *SoSUT1* durchgeführt (Riesmeier und Frommer, 1994, Leggewie *et al.* 2003).

### **3.3 Anzucht, Behandlung und Vermehrung der Pflanzen**

#### **3.3.1 Gewebekultur**

*In vitro* Pflanzen wurden in Plastikbechern auf einem modifizierten festen MS Medium (Murashige und Skoog, 1962) von Sigma-Aldrich (Deisenhofen), mit 2% w/v Saccharosezusatz (Kartoffel, Tabak) oder 3% w/v (Tomaten) und entsprechenden Antibiotika kultiviert. Zusätzlich enthielt das Medium 0,8% w/v BiTec Agar. Die pH-Wert des MS-Mediums wurde vor dem Autoklavieren mit 1 M KOH auf pH 5,8 eingestellt. Die Kultivierung erfolgte im Anzuchtsraum unter Langtagbedingungen (16 h-Tag) mit PPF<sub>D</sub> 1000  $\mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  bei 24 °C und 50 % Luftfeuchtigkeit. PPF<sub>D</sub> wurde mit dem Gerät LI-189 (LI-COR, Lincoln, NE, USA) determiniert. Die Pflanzen in Sterilkultur wurden als Stecklinge gehalten und alle 5 Wochen auf frisches MS-Medium umgesetzt.

#### **3.3.2 Präparation der Kartoffel-Stängel für die Sterilkultur**

Um die Gewebekultur der Kartoffel-Pflanzen zu starten, wurden Stängel von 4-6 Wochen alten Pflanzen, die noch nicht blühen, verwendet. Kartoffelknoten-Segmente mit mindestens einer Achselknospe wurden präpariert und in 70 % (v/v) Meliseptol® (B. Braun Melsungen AG, Melsungen) für 3 Minuten sterilisiert. Anschließend wurden die Stängel-Teile für 15 Minuten in einer 3%igen (v/v) Natriumhypochloridlösung mit Tween 20 (0,4 ml pro Liter)



gewaschen und nach Entfernen der Lösung des Hypochlorids wurden sie dreimal in sterilem Wasser abgespült. Die präparierten Stängel wurden ins 2MS Medium in die Plastikbecher gesteckt. Die Achselknospe der Stängel keimten in 7 bis 10 Tagen als Seitentriebe. 7 bis 10 Tage später wurden die aus Achselknospen keimenden Seitentriebe abgeschnitten und als neue Pflanze auf frisches 2MS Medium umgesetzt. Nach Bewurzelung wurden die Pflanzen alle 5-6 Woche umgesetzt.

### **3.3.3 Erzeugung von *in vitro* Knollen**

Stecklinge mit je einer Achselknospe wurden von 6 Wochen alten Kartoffelpflanzen aus Sterilkultur präpariert. Die Explantate wurden in Kulturbehälter mit 5, 8 oder 10MS Medium (MS+5, 8 oder 10 %w/v Saccharosezugabe) gestellt. Es wurden 10 Stecklinge pro Becher ausgesetzt (ca. 10 ml Medium pro Explantat) und so im Anzuchtraum unter oben beschriebenen Langtagsbedingungen für eine Woche gelassen. Danach werden die Kulturen abgedunkelt. Die Knollenbildung erfolgte innerhalb von 10 Tagen. Die Mikroknollen wurden nach 20 Tagen geerntet und analysiert.

### **3.3.4 Phytokammer**

Experimente unter LT-Bedingungen (16 h Lichtperiod), KT-Bedingungen (8 h Lichtperiod) sowie auch Rhythmusanalysen wurden in der Phytokammer bei einer konstanten Temperatur von 24 °C durchgeführt. Pflanzen für die Analyse der circadianen Rhythmik wuchsen 7 Wochen in der Phytokammer unter LT-Bedingungen, dann wurde die Phytokammer für das Dauerlicht oder Dauerdunkel umprogrammiert. Während der Lichtperiode wurden die Pflanzen mit etwa 250 bis 300  $\mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  beleuchtet (PPFD wie oben determiniert). Dunkelproben wurden bei grünem Licht geerntet.

Die Anzucht von Kartoffel-Pflanzen für das Experiment unter Bedingungen künstlicher Beschattung wurde in der Phytokammer bei 24 °C im LT und Beleuchtung 290  $\mu\text{mol Photonen} \cdot$

$\text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  durchgeführt. Als Lichtquellen wurden Osram L36W-31 (weisses Licht) und zusätzlich eine Infrarotlampe (Chopper light type 730 mit dem Filter Hama 730 nm, Chopper Light GmbH, Berlin). Es wurden die mit dem Infrarotlicht-behandelte Pflanzen mit einer schwarzen undurchsichtigen Folie getrennt. Der Versuch wurde mit WT und 3 verschiedenen StSUT4-RNAi Kartoffel-Linien wiederholt.

### 3.3.5 Gewächshaus

Pflanzen wurden bei 60% Luftfeuchte in einem Licht/Dunkelrhythmus von 16 h Licht (22°C) und 8 h Dunkelheit (15°C) gezogen. Die Lichtintensität PPFD bei einer Wellenlänge zwischen 400 und 700 nm war  $150 \mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ . Zwei Lampenarten: *high-pressure sodium lamps SON-T Green Power* und *metal halide lamps MASTER LPI-T Plus* (Philips Belgium, Brussels) haben das Gewächshaus beleuchtet.

Als Eingangsmaterial für die Gewächshauspflanzen dienten entweder Pflanzen aus Sterilkultur, oder Knollen (nach 3 Monaten Ruhezeit im Dunkeln bei 4°C) oder Stecklinge von adulten Pflanzen. Dichte der Pflanzen war 5-7 Töpfe pro Quadratmeter. In einem Topf wurde eine Pflanze mit einem Stängel gelassen.

## 3.4 Beschattungsexperiment

Für diese Untersuchung wurde Beschattung durch hohe Dichte (21 Pflanzen pro Quadratmeter) der Pflanzen erreicht, die zusätzlich mit höheren Tabak-Pflanzen umgeben wurden. Als Kontrolle wurden weit auseinander stehende Pflanzen verwendet (7 Pflanzen pro Quadratmeter). Es wurden zwei Parameter: PPFD und HR:DR-Verhältnis (Kapitel 4.13.1, Abb. 4.13.1-1) gemessen. PPFD wurde mithilfe des LI-189 (LI-COR, Lincoln, NE, USA) und R:FR-Verhältnis mit einem Spektroradiometer FieldSpec Pro II FR (mit einem integrierten Remote Cosine Rezeptoren) (Analytical Spectral Devices, Inc., Boulder, Colorado, USA).

### **3.5 Pfropfversuche**

Die Pfropfung der Pflanzen wurde nach dem Protokoll von Martinez-Garcia *et al.*, 2001 durchgeführt. Für die Pfropfung wurden Pflanzen in einem Stadium mit 4-6 Blättern verwendet. Vor der Verbindung mit der Pfropfunterlage wurden der Pfropfreis für einige Minuten in 2,5 mM Wasserlösung EDTA eingetaucht. Nach der Pfropfung wurde jede Pflanze mit einer Schutzhülle zwecks Vermeidung von Wasserverlust für ungefähr 10 Tage bedeckt.

### **3.6 Pflanzenmaterial für die Apex-Analysen**

Mehrere Knollen von WT und *StSUT4*-RNAi Linien 10 und 81 Désirée-Kartoffeln wurden im Gewächshaus unter den oben beschriebenen Bedingungen auf einer großen Schale mit Erde ausgelegt. Knollen keimten nicht gleichzeitig, was die Analyse von Pflanzen unterschiedlichen Alters ermöglichte. Die neuen Keimlinge wurden sukzessiv in die Töpfe umgesetzt. Nach ungefähr 4 Wochen, wenn die erste WT Pflanzen sichtbare Blütenknospen bekamen, wurden alle transgene und WT Pflanzen nach der Zahl der *Source*-Blätter in sieben Gruppen (bis 2 *Source*-Blätter; 3-4; 5-6; 7-8; 9;10 und >10 *Source*-Blätter, Abb. 39) sortiert. Von jeder Gruppe der Pflanzen wurden 2 bis 3 Apizes geerntet und es wurde mithilfe des Binokulars ihre Entwicklungsphase (vegetativ oder generativ) identifiziert. Übrige Apizes wurden für die Saccharosebestimmung verwendet.

### **3.7 Gibberellinsäure-Behandlung**

Désirée-Kartoffelpflanzen, die 4 bis 6 Blätter hatten und im Gewächshaus in oben beschriebenen Bedingungen wuchsen, wurden mit 20  $\mu$ M GA<sub>3</sub> Lösung mit 0,3ml Tropfen Triton X-100 pro Liter, alle 2 Tage über einen Zeitraum von 2 Wochen besprüht. Für das Kontrollexperiment wurde Wasser mit Triton X-100 verwendet.

## 3.8 Bakterienstämme und Anzucht

*E.coli* DH5 $\alpha$  (Gibco-BRL, unveröffentlicht) (F<sup>-</sup>, end A1, hsdR17 (rk<sup>-</sup>, rk<sup>+</sup>), supE44, thi-1, recA1, gyrA96, relA1, D(argF<sup>-</sup>lacZya), U169, Ø80dlacZDM15) wurde nach Sambrook *et.al.* (1989) angezogen.

*Agrobacterium tumefaciens* GV6620 (Vervliet *et al.*, 1975, Deblaere *et al.*, 1985) wurde bei 28°C auf YEB-Medium mit Ampicillin (100 µg/ml) und Rifampicin (100 µg/ml) angezogen.

### 3.8.1 Transformation der Bakterien

Für die *Escherichia coli*-Transformation, sowie auch *Agrobacterium*-Transformation wurde die Elektroporation-Methode angewendet (Shen und Forde, 1989). Die Methode erforderte die Vorbereitung elektrokompenter Bakterienzellen (Shen und Forde 1989).

## 3.9 Herstellung des RNAi Konstruktes

In der Arbeitsgruppe von Frau Dr. Christina Kühn wurde ein RNAi-Vektor konstruiert, der auf den pRT Vektor (Töpfer *et al.* 1987) zurückgeht und eine Intronsequenz des Aminosäuretransporters AAP6 aus *Arabidopsis* enthält (freundlicherweise von Axel Hirner, ZMBP, Universität Tübingen zur Verfügung gestellt). Zu den beiden Enden der Intronsequenz wurden zwei *StSUT4* Fragmente, eines in sense- und das zweite in antisense- Orientierung hinter den CaMV 35S Promoter, kloniert. Isolation der *StSUT4* cDNA erfolgte nach der von Weise *et al.*, 2000 beschriebenen Prozedur. Ein 989 bp langes Fragment wurde mittels *StSUT4* Primer (Forward Primer: TAT GGT ACC ATG CCG GAG ATA TAG AAA GG und Reverse Primer: GAGA CTC GAG TGC AAA GAT CTT GGG TTT CTC) amplifiziert und anschließend mithilfe der *XhoI* und *SmaI* Restriktionsenzymen verdaut und in die *SalI* and *SmaI* Re-

striktionsstelle des pRT-RNAi in *sense*-Orientation kloniert. Der zweite Fragment *StSUT4* wurde nach *XhoI-SmaI*-Verdauung in *antisense*-Orientation die *XhoI* und *Ecl136I* Restriktionsstellen des pRT-RNAi kloniert. Danach wurde ein 3,5 kb *PstI* Fragment (mit beiden *StSUT4* Inserte) aus dem pRT-RNAi in den binären Vektor pJH212 (ein Derivat des pPZP212) hereingestellt.

### 3.10 Herstellung der *StSUT4* RNAi Kartoffeln

Mit Hilfe des *StSUT4*-RNAi-Vektors wurden Kartoffeln der Varietät Désirée, sowie Tomatenpflanzen transformiert (Chincinska *et al.*, 2008, Boldt *et al.* unpubliziert).

Transformation der Kartoffelpflanzen *Solanum tuberosum* L. Varietät Désirée sowie auch *Solanum tuberosum* Andigena erfolgte mittels der von Rocha-Sosa (1989) beschriebenen Methode.

Überprüfung der transgenen Pflanzen auf Vorhandensein des Transgens wurde nach Isolierung genomischer DNA durchgeführt (Sambrook *et al.*, 1989). Für die Selektion der Transformanten wurde die Integration des Konstruktes in regenerierten Pflanzen mithilfe der *polymerase-chain-reaction* (PCR)-Technik geprüft: zunächst mittels spezifischen Primern für das Kanamycingen NPTII PCR (NPTIIa: ACC GGA TCT GGA TCG TTT CG, NPTIIb: TTG GTC CCT CAT TTC GAA CC) und danach mit den Transgen-spezifischen Primer *StSUT4*-RNAi (*StSUT4*-RNAi: GAG ACT CGA GTG CAA GAT CTT GGG TTT CTC und *Intron out rev*: GAT GAT TTA TGT ATA TAA CAA CG).

Folgende PCR-Bedingungen wurden angewendet:

## Verifizierung von transformierten Pflanzen mit NPTII Primer

Für die PCR Reaktion 100 ng genomischer DNA als Matrize, 100 nMol von Primer NPTIIa und NPTIIb, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 1 U Taq-Polymerase verwendet wurde. Die Temperaturabfolge: 3 min bei 96°C; 0,5min Denaturation bei 96°C; 0,5min Annealing bei 55°C; 0,5min Elongation bei 72°C; 5 Min 72°C; Pause 4°C wurde eingestellt. Schritte von der Denaturierung bis Elongation wurden 30-mal wiederholt.

## Analyse der transformierten Pflanzen mit Gen-spezifischen Primer

Der PCR-Mix wurde wie oben beschriebener vorbereitet. Maximal 100 ng genomischer DNA als Matrize wurde benutzt. Transgen-spezifische Primer: *StSUT4*-RNAi und *intron out rev* , wurden verwendet. Die Temperaturabfolge: 3 min bei 96°C; 0,5min Denaturation bei 96°C; 0,5min Annealing bei 52°C; 0,5min Elongation bei 72°C; 10min 72°C; Pause 4°C wurde eingestellt. Schritte von der Denaturierung bis Elongation wurden 35-mal wiederholt.

Alle PCR-Reaktionen wurden im Thermoblock (Biometra, Göttingen), durchgeführt. Die amplifizierten PCR-Produkte wurden auf 1% Agarosegelen überprüft (Sambrook *et al.*, 1989). Die Pflanzen, deren Genom erfolgreich transformiert wurde, wurden hinsichtlich der endogenen *SUT4*-Expression untersucht.

## **3.11 Quantitative Transkriptanalyse**

### **3.11.1 RNA-Isolation aus Pflanzengewebe**

Die RNA aus verschiedenen pflanzlichen Organen wurde mittels Trisure® (Bioline, Luckenwalde, Germany) oder peqGold Trifast® (Peqlab, Erlangen, Germany) laut Herstellerproto-

koll extrahiert. Nach der Extraktion erfolgte ein DNase-Verdau mittels RNase-free DNase (Qiagen, Hilden, Germany). Konzentration und Qualität der RNA wurde spektrophotometrisch und mittels Agarosegelelektrophorese kontrolliert (Sambrook *et al.*, 1989).

### **3.11.2 cDNA-Synthese**

Die Erststrangsynthese wurde durch reverse Transkription mit Hilfe eines Qiagen Omniscript RT Kit laut Herstellerprotokoll durchgeführt. Dazu wurde 1µg DNase behandelte RNA als Matrize verwendet.

### **3.11.3 Quantitative Echtzeit PCR (*real time* qPCR)**

Die mRNA-Quantifizierung via *real time* PCR (qPCR) wurde in Anwesenheit von SYBR Green mit HotGoldStar DNA Polymerase (Eurogentec, Seraing, Belgium) in dem Rotor Gene 3000 Cycler (LTF Labortechnik, Wasserburg, Germany) mit Hilfe von Rotor Gene Software Version 4.6.94 durchgeführt. 100-fach Verdünnung der cDNA von RT-Reaktion im 20 µl Reaktionsvolumen diente als Matrize für die qPCR. Primer wurden mittels einer Primer3-Software ([http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)) entworfen (Tabelle 1).

Standard-Primer (Ubi3 oder TEF1) wurden zur Normalisierung der Transkription des untersuchten Gens mit einem Referenzgen verwendet. Die Amplikonlänge war zwischen 50 und 150bp. Amplifikation wurde beim folgenden Temperaturprofil: 0,5min bei 95°C Denaturation; 0,5min bei 61°C Annealing und 0,5min bei 72°C Elongation durchgeführt. Das Programm wurde auf 45 Zyklen eingestellt. Die amplifizierten Reaktionsprodukte wurden mittels Elektrophorese auf 1% Agarosegelen überprüft.

Tab. 1 Die zur qPCR-Analysen verwendeten Primer

Name	Zielgen	Forward	Reverse
Ubi	<i>Ubi3 (Ubiquitin3)</i>	CAC CAA GCC AAA GAA GAT CA	TCA GCA TTA GGG CAC TCC TT
LeTEF1	<i>TEF (Translation Elongation Faktor EF-1<math>\alpha</math>)</i>	TGG AAC TGT GCC TGT TGG TC	ACA TTG TCA CCA GGG AGT GC
LCSUT1	<i>SUT1</i>	TTC CAT AGC TGC TGG TGT TC	TAC CAG AAA TGG GTC CAC AA
St SUT2	SUT2	GGC ATT CCT CTT GCT GTA ACC	GCG ATA CAA CCA TCT GAG GGT AC
St SUT4	SUT4	GCT CTT GGG CTT GGA CAA GGC	GGC TGG TGA ATT GCC TCC ACC
St PhyB	<i>PhyB (Phytochrom B)</i>	TTT GCC TGA TGC TGG GTA	CTT TGC ACC ACC CCA CTT TA
GA20ox1	<i>StGA20ox1 (GA20 Oxidase1)</i>	CAA GAT TGT GTT GGC GGA CT	ACT GCT CTG TGC AGG CAA CT
St PhyA	<i>PhyA (PhytochromA)</i>	TGC TCA CTC TCG TGG AGG AT	CCC TGC AAT GCT AAT TCC AA
St COL3	<i>St COL3 (CONSTANCE LIKE 3)</i>	CTT CAA ACT CCC ATC CAC GA	TTG GAG TAA GCT GGG GAG GT
St COL1	<i>St COL1 (CONSTANCE LIKE 1)</i>	ATG AGC GGT TTC CGG TAG TT	TCA TCA GCA GCA TCA GCA TC
ST FT	<i>St FT (FLOWERING LOCUS T)</i>	GTG GAT CCT GAT GCT CCA AG	TTC CTG TGG TTG CTG GGA TA
St SOC1	<i>St SOC1 (SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CO)</i>	TCC AGC ACG CAG GAG ATA AT	CCA GCT TGG TTT TCA GGT TG

Nachdem die Vervielfältigungseffektivität für jede Probe individuell mit Hilfe der LinReg-PCR-Software bestimmt worden war, wurde der relative Transkript-Gehalt des untersuchten Gens als Prozent des Referenzgen-Transkript-Gehalts im analysierten Material berechnet. Dazu wurde die folgende Formel:



$$(Ct_R^{EffR}/Ct_Z^{EffZ}) * 100\%$$

$Ct_Z$  ist Ct-Wert (*cycle threshold*) der Zielgenamplifikation;  $Eff_Z$  ist die PCR-Effizienz der Zielgenamplifikation;  $Ct_R$  ist Ct-Wert der Referenzgenamplifikation;  $Eff_R$  ist die PCR-Effizienz der Referenzgenamplifikation.

## **3.12 Analyse von Kohlenhydraten**

### **3.12.1 Enzymatische Bestimmung der löslichen Zucker**

60-120mg Material aus pflanzlichen Geweben (Knollen, Stolon, Blätter, Blüte, Apex) wurde in flüssigem Stickstoff homogenisiert und bei 70°C für eine Stunde in 500-1000µl 80% Ethanol extrahiert. Nach der Zentrifugation (10Minuten, 13000 x g bei 4°C) wurde 10-20µl des Überstandes mit 780-790 µl Karbopuffer (100mM Imidazol-HCl pH 6,9, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 2mM NADPH, 1mM ATP und 2U/ml Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase aus *Leuconostoc*) versetzt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und die Absorption wurde bei 334nm (Nullabgleich) spektrophotometrisch gemessen. Nach Zugabe der Enzyme: 0,5U Hexokinase 2U Phosphoglucoisomerase und 20U Invertase wurde erneut die Absorption nach jeweils 10min Inkubation gemessen. Anhand des Absorptionsanstiegs, der durch das entstehende NADH (Absorptionsmaximum bei 340 nm Wellenlänge, Extynktion-Koeffizient von 6,3 mM/cm) verursacht wird, wurden die Ursprungskonzentrationen der löslichen Zuckern (Glukose, Fruktose- und Saccharose) im Überstand quantifiziert (Stitt *et al.*, 1989, Mustroph, 2005).

### **3.12.2 Stärkebestimmung**

Zur Bestimmung des Stärkegehalts wurde das während der Extraktion der löslichen Kohlenhydraten entstehende Pellet (3.12.1) verwendet. Das Pellet wurde für eine Stunde bei 50°C

getrocknet, homogenisiert und in 400 µl 0,2M KOH für 1 h bei 94°C inkubiert. Dann wurde eine Neutralisierung mit 70µl 1M Essigsäure und anschließende Zentrifugation (13000 x g durchgeführt. Der Stärkegehalt wird nach einer Inkubation bei 55°C über Nacht (je 50µl des Extraktes mit 100 µl Lösung von Amyloglukosidase (2 mg \* ml<sup>-1</sup>) in Na-acetatpuffer (50mM pH 5.2)) quantifiziert. Der Stärkegehalt wurde anhand der enzymatische Bestimmung der Glukose (oben beschrieben) im Überstand berechnet (Stitt *et al.*, 1978 Mustroph, 2005).

### **3.12.3 Stärkefärbung**

Das Blattmaterial wurde in 80% Ethanol bei 90°C gekocht, so lange bis die Blätter vollständig entfärbt waren. Anschließend wurden die Blätter in Lugol'scher Lösung getaucht und nach ungefähr 10 Minuten wurde der Effekt dokumentiert.

### **3.12.4 Effluxmessungen**

Für die Bestimmung der Saccharosekonzentration in Phloemexudaten wurde das fünfte Blatt von oben verwendet. Um Kallosebildung zu verhindern, wurde das Ende des Blattstiels submers abgeschnitten. Jede Stunde wurde das Ende des Blattstiels in ein neues Eppendorfgefäß mit 1 ml 2,5 mM EDTA Lösung überführt. Die Blätter wurden mit einer transparenten Haube abgedeckt, um die Transpiration zu minimieren. Jedes Mal bevor die Blätter in die neuen Eppendorfgefäße gesteckt wurden, wurde das Gewicht bestimmt, um die Intensität der Transpiration zu bestimmen. Bei jeder Probennahme wurde außerdem das aktuelle Volumen der Lösung im Eppendorfgefäß notiert. Saccharosekonzentration wurde enzymatisch bestimmt (wie im Kap. 3.12.1) und auf das jeweilige Blattgewicht bezogen.

### **3.12.5 Knollendichtemessung**

Zur Bestimmung der Knollendichte wurde die Masse und das Volumen der Knollen ermittelt. Jede Knolle wurde gewogen und das Volumen anhand der Wasserverdrängung bestimmt.

Dazu wurde die ganze Knolle in einem mit Wasser gefüllten Laborzylinder getaucht und die Wasserverdrängung anhand des Volumenanstiegs im Messzylinder gemessen. Die Knollendichte wurde nach der folgenden Formel: Dichte  $\delta$  = Gewicht / Volumen berechnet.

### 3.13 HPLC Analysen

100mg Blattmaterial wurde in flüssigem Stickstoff mit 600 $\mu$ l 80% Aceton mit 10 $\mu$ M KOH homogenisiert. Die Proben wurden für 10min bei 4°C und 13,000rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in neuem Eppendorfgefäß gesammelt. Das Pellet wurde erneut mit 400 $\mu$ l 100% Aceton extrahiert. Der Zentrifugationsschritt wurde wiederholt und danach die Überstände vereinigt und nochmal wie vorher zentrifugiert. Dann wurden ~800  $\mu$ l vom Extrakt in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Für die HPLC Analysen wurden die Proben direkt vor dem Einfüllen der Säule noch mal zentrifugiert.

Das HPLC-System Agilent 1100 Series (Hewlett-Packard) und die RP-18-Säule wurde für die Pigmentanalyse angewendet. Das Injektionsvolumen der Proben betrug 50  $\mu$ l oder 100  $\mu$ l. Bei einer Flussrate von 1 ml \* min<sup>-1</sup> wurde die Säule mit folgendem Gradientenprogramm entwickelt: 0 – 1 Min isokratisch 100 % A, 1 – 34 min linearer Gradient von 100 % A zu 100 % B, 34 – 37min isokratisch 100 % B, 37 – 41min isokratisch 100 % A. Laufmittel A war Acetonitril/H<sub>2</sub>O/Triethylamin (180:20:0,2) und Laufmittel B war Ethylacetat. Die mittels des Diodenarray-Detektors erstellten Chromatogramme ermöglichten eine Peak- Identifikation. Die Peakflächen wurden mittels der HPLC-Software integriert (Thayer und Björkman,1990; Voitke *et al.*, 1994). Mithilfe des HPLC-Systems wurden folgenden Pigmente: Neoxanthin, Antheraxanthin, Violaxanthin, Lutein, Zeaxanthin, Chlorophyll b, Chlorophyll a, und  $\beta$ -Carotin detektiert und quantifiziert. Aus dem Gehalt der Carotenoiden des Xanthophyll-Zyklus wurde außerdem der De-Epoxidations-Status (DEPS) nach der folgenden Formel berechnet:

$$\text{DEPS [rel U]} = Z + 0,5 * A / (VAZ)$$

Z ist der Zeaxanthingehalt; A ist Antheraxanthingehalt und V bezeichnet den Violaxanthingehalt.

### **3.14 Spektrophotometrische Anthocyanbestimmung**

Die Anthocyanextraktion wurde nach der von Schmidt und Mohr beschriebenen Methode durchgeführt. Der Extrakt wurde bei  $\lambda = 635 \text{ nm}$  und  $\lambda = 650 \text{ nm}$  spektrophotometrisch gemessen. Ein relativer Anthocyangehalt wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Anth. [rel U]} = \text{OD}_{535} - \text{OD}_{650} \text{ (Schmidt und Mohr 1981)}$$

### **3.15 Statistische Auswertung der Experimente**

In der Arbeit wurden entweder zusammengefasste Ergebnisse dargestellt, oder Ergebnisse, die den typischen Verlauf aller durchgeführten Experimente wiedergeben. Im ersten Fall wurden die Mittelwerte und die Standardabweichung (SD) berechnet. Die Statistische Auswertung wurde mit der Computersoftware Microsoft Excel® gemacht. Die signifikanten Unterschiede wurden mit Hilfe des T-Tests und F-Tests berechnet und sofern nicht anders angegeben, als (\*) für  $p < 0,05$  bezeichnet. Anzahl der Experimente und die Größe der Probenzahl sind im Ergebnisteil angegeben.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Expression der Saccharosetransporter in Kartoffelpflanzen

Da das *SUT4*-Gen in Pflanzen extrem schwach exprimiert ist (durch Northern Blots nicht detektierbar), war für die Expressionsanalyse des Gens die Anwendung einer sehr sensitiven Methode nötig. Für die Bestimmung der Genexpression des *StSUT4* wurde in der vorliegenden Arbeit die quantitative *real time* PCR-Analyse des Transkriptgehalts (qPCR) verwendet.

#### 4.1.1 Quantitative *real time* PCR (qPCR) als Methode zur Analyse der Genexpression

Der Transkriptgehalt im biologischen Ausgangsmaterial wurde durch Quantifizierung des cDNA-Amplifikationsprodukts in der exponentiellen (log-linearen) PCR-Reaktionsphase berechnet (Ramakers *et al.*, 2003, Wong und Medrano, 2005). Es wurde eine Methode angewendet, in der die mRNA-Expression des Zielgens mit einem Referenzgen normalisiert (relative Quantifizierung) und als Prozent des Referenzgen-Transkriptgehalts dargestellt wurde (normalisierte Werte) (Vandesompele *et al.*, 2003). In Gegensatz zu der Bestimmung von absoluten Werten reduziert die Normalisierung der Werte die Beeinflussung der Ergebnisse durch die Qualität der RNA und der von ihr stammenden cDNA in hohem Maß (Fleige und Pfaffl, 2007). Zur Normalisierung der qPCR-Ergebnissen wurden die Primer von 2 Standard-Referenzgenen: Translation Elongations-Faktor EF-1 $\alpha$  (TEF) und Ubiquitin 3 (Ubi) angewendet. Anhand der Literatur sowie den selbst durchgeführten Tests wurde angenommen, dass die beiden Gene ein stabiles Expressionsniveau zeigen (Nicot *et al.*, 2005, Hackel *et al.*, 2006, Chincinska *et al.*, 2008 und unpublizierte Daten). Die Kontrollexperimente, die die mit beiden Primerpaaren normalisierten Werte zusammenstellen und vergleichen sollten, zeigten die Übereinstimmung der berechneten Mittelwerte. Jedoch die Anwendung von *TEF1*-Primer

für Tomatenanalysen und *Ubi* für Kartoffelanalysen ließ die Standardabweichungen von den Ergebnissen im größten Ausmaß reduzieren (ungezeigte Daten).

Für die Endergebnisse der mRNA-Quantifizierung ist der Verlauf der *real time* PCR entscheidend. Da sogar kleine Variationen in PCR-Effektivität zu einer fehlerhaften Interpretation der Ergebnisse führen können (Peirson *et al.* 2003; Ramakers *et al.*, 2003, Wong und Medrano, 2005), wurde in der Arbeit anhand der Rohdaten die jeweilige PCR-Effektivität für jede amplifizierte Probe individuell mit Hilfe der LinReg-PCR-Software bestimmt und diese dann in der Berechnung des Transkriptgehalts in den Ausgangsproben berücksichtigt (Ramakers *et al.*, 2003).

#### **4.1.2 Gewebe-spezifische Expression des SUT4**

Es ist gelungen, den Gehalt der *SUT4* mRNA in verschiedenen Organen von Kartoffeln der Varietät Désirée mittels *real time* PCR zu ermitteln (Abb. 1). In allen für die Analyse ausgewählten *Sink*-Organen war die *SUT4*-Transkript-Akkumulation signifikant höher als in *Source*-Blättern. Die *SUT4*-Expression war in den reifen Blättern etwa 5-mal schwächer als in jungen. Es wurde ein erhöhter Gehalt von Transkripten des *SUT4* in generativen Organen (Knospen und Blüte) festgestellt. In vegetativen Vermehrungsorganen, in Knollen, wurde das höchste Niveau der relativen Expression im Parenchymgewebe der 3cm Ø großen Knollen nachgewiesen. Im Cortex der selben 3cm Ø Knollen gab es wesentlich weniger *SUT4*-Transkripte als im Parenchymgewebe und auch weniger als im Gewebe von jüngeren 0,5 und 1cm Ø Knollen. Starke Expression wurde auch in oberirdischen und unterirdischen Stängelteilen (im sog. Stolon) festgestellt. Das Gewebe der Wurzeln zeigte ebenfalls die für *Sink*-Organe typisch erhöhte *SUT4*-Expression.

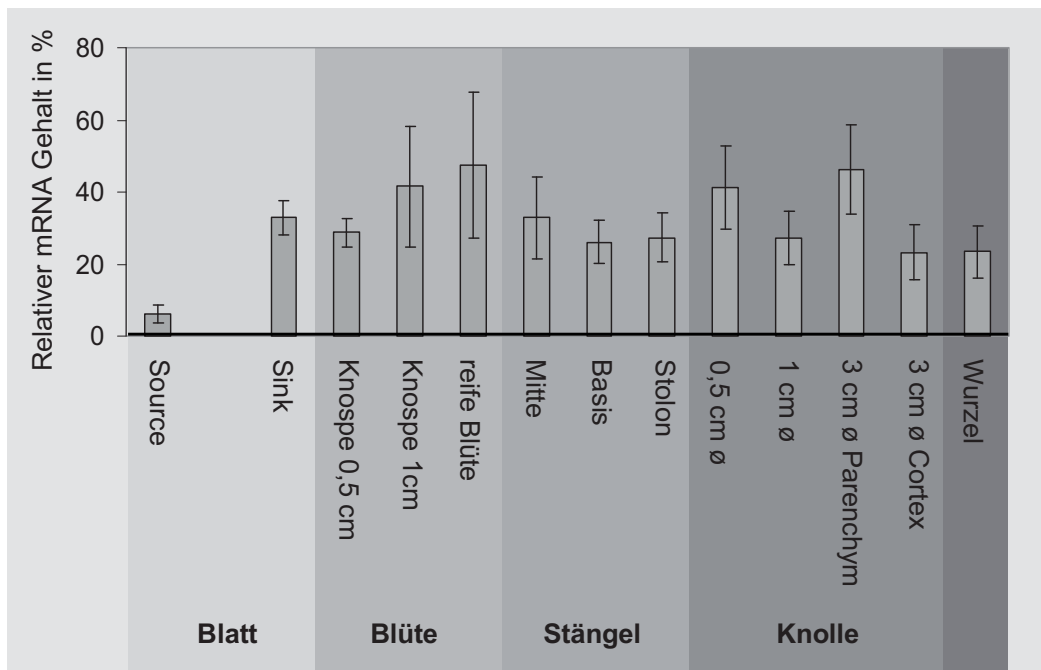


Abb. 1: Akkumulation der *StSUT4* Transkripte in *Source*-Blatt und verschiedenen *Sink*-Organen vom Kartoffel-Wildtyp der Varietät Désirée. Die *SUT4*-Transkript-Akkumulation in allen *Sink*-Organen war signifikant höher als in *Source*-Blättern. Mittelwerte  $\pm$  SD von mindestens 3 Messungen. Das pflanzliche Material wurde mittags gegen 15 Uhr geerntet.

#### 4.1.3 Analyse der diurnalen Expression der Saccharosetransportern-Gene

In reifen Tomatenblättern wurde bereits nachgewiesen, dass die *LeSUT1* Expression einer diurnalen Regulation unterliegt (Kühn *et al.* 1997). In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob das SUT1 Homolog aus Kartoffeln auch einer diurnalen Regulation unterliegt. Dabei ergab sich aber noch die Frage, ob die diurnale Expression nur SUT1 betrifft oder auch für die beiden anderen Saccharosetransporter, SUT2 und SUT4, charakteristisch ist.

Zur RNA-Extraktion wurden *Source*-Blätter-Proben aus Kartoffelpflanzen, die unter Langtagbedingungen wuchsen, alle drei Stunden über die gesamte Tag/Nacht-Periode geerntet. Im Tagesverlauf wurde oszillierende Transkriptmenge nicht nur des *StSUT1*, sondern auch *StSUT2* und *StSUT4* nachgewiesen (Abb. 2).

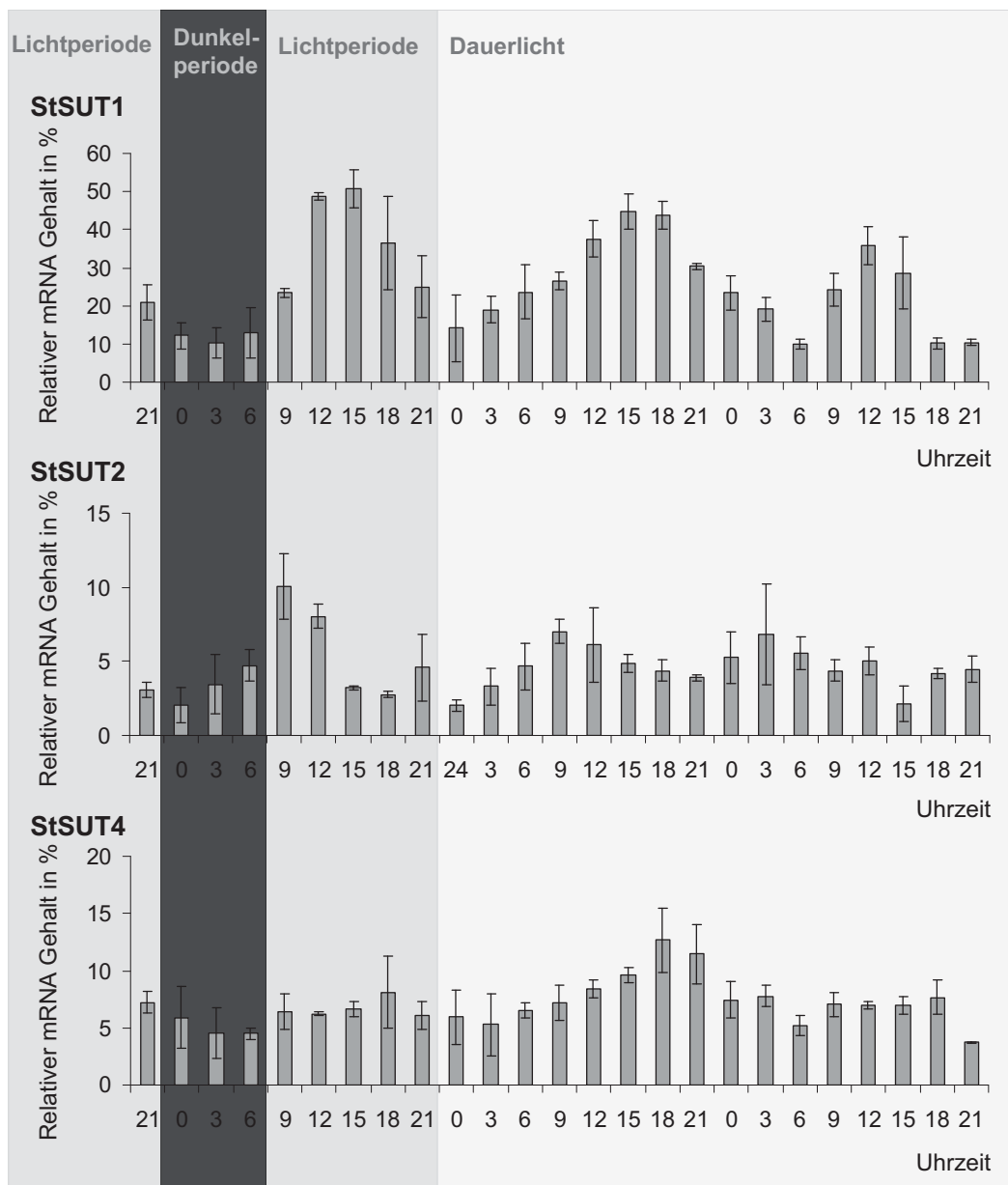


Abb. 2: Periodisches Oszillieren des Transkriptgehalts von Saccharosetransportern in *Source*-Blättern von Désirée Kartoffelpflanzen. Mittelwerte  $\pm$  SD des relativen Transkriptgehalts in 3-5 Proben von mindestens 3 Pflanzen wurden dargestellt. Die ersten 24 Stunden der Analysen wurden die Kartoffelpflanzen im LT gehalten. Danach wurden die Pflanzen für 48 h unter Dauerlichtbedingungen gehalten. Eine unterschiedliche Skalierung wurde angewendet.

Die *StSUT1*-Transkriptakkumulation steigerte sich während der Lichtperiode, und erreichte gegen 15 Uhr das Maximum. Dann sinkt die Transkriptmenge des *StSUT1* sukzessiv am Ende der Lichtperiode und bleibt während der Dunkelperiode auf einem niedrigen Niveau. Ähnlich wie bei *StSUT1* wurde bei *SUT4* das Maximum der mRNA-Akkumulation gegen Mitte der Lichtperiode und das Minimum in der Nacht erreicht. Die Expressionsschwankungen, denen



der *SUT4* unterliegt, sind jedoch nicht so deutlich wie im Fall des *SUT1*. Expression von *SUT2* zeigt eine deutliche diurnale Oszillation, jedoch die maximale Transkriptakkumulation wurde am Anfang der Lichtperiode festgestellt.

Um zu beantworten, ob die oszillierende Expression unabhängig vom Tag/Nacht Rhythmus der Belichtung agiert, wurde zusätzlich die Analyse des Transkriptgehalts unter konstanten Lichtbedingungen durchgeführt (Abb. 2). Pflanzen, die in im LT aufgewachsen sind, wurden ins Dauerlicht überführt. Im Abstand von 3h wurde Pflanzenmaterial für die RNA-Analysen verwendet, wobei die letzten Proben nach 48h Belichtung genommen wurden. Die Expression der *SUT1* und *SUT2* Gene unter Dauerlichtbedingungen zeigten deutliche oszillierende Schwankungen, wobei verschoben sich die Expressionsmaxima in beiden Fällen auf früheren Zeitpunkte des Tages (Abb. 2).

#### 4.1.4 *SUT1* Expression in konstanter Dunkelheit

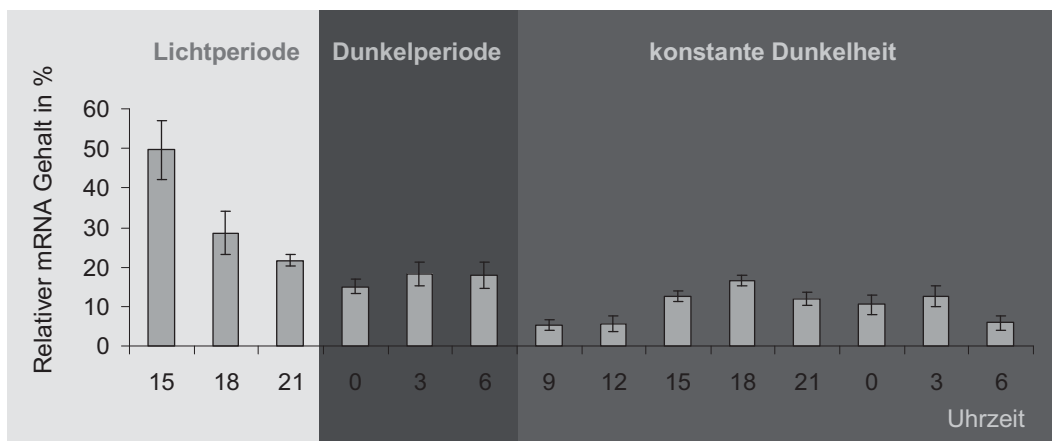


Abb. 3: Akkumulation der *StSUT1*-Transkripte in Wildtyp *Source*-Blättern von Kartoffelpflanzen der Varietät Désirée während der verlängerten Dunkelheit. Mittelwerte  $\pm$  SD des relativen Transkriptgehaltes in 3-5 Proben von mindestens 3 Pflanzen wurden dargestellt. Die unter LT-Bedingungen wachsenden Pflanzen wurden in die Dauerdunkelbedingungen gestellt.

Weitere Untersuchungen der Expression von *SUT*-Genen wurden unter konstanter Dunkelheit durchgeführt. Für *SUT1* konnte ein schwaches Oszillieren der Expression während der ersten

24 Stunden der Dauerdunkelheit, mit einem Maximum gegen 18 Uhr, nachgewiesen werden (Abb. 3). Nach 24h in konstanter Dunkelheit, sank die *SUT1*-Expression an die Nachweisgrenze, was eine detaillierte Bestimmung des RNA-Gehaltes für längere Dunkelperiode nun möglich machte (Daten nicht gezeigt). Die Transporter StSUT2 und StSUT4 zeigten im Dunkeln ebenfalls nur sehr geringe Expression in Wildtyp *Source*-Blättern, wodurch eine genauen Analysen der mRNA-Gehalte nicht möglich war.

## 4.2 Herstellung der *StSUT4*-RNAi Désirée-Kartoffeln und Tomaten

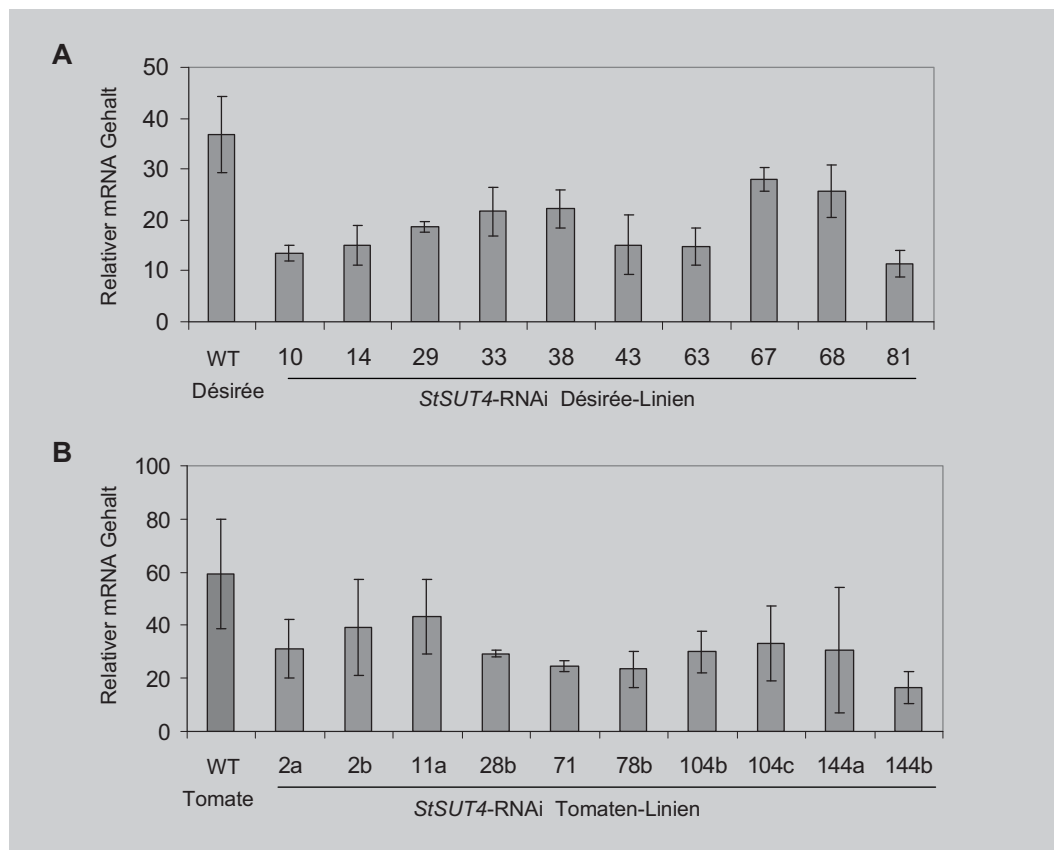


Abb. 4 Reduktion des *StSUT4*-Transkriptgehalts in den reifen Blüten von transgenen *StSUT4*-RNAi Linien im Vergleich zu den entsprechenden Wildtyp- Kontroll-Pflanzen A. Kartoffelpflanzen der Varietät Désirée B. Tomaten. Mittelwerte  $\pm$  SD für 3-5 Proben von mindestens 3 Pflanzen sind dargestellt. Die Unterschiede zwischen transgenen und Wildtyp Pflanzen waren alle signifikant. Eine unterschiedliche Skalierung wurde angewendet.

Die Reduktion der *SUT4*-Expression wurde mittels einer Technik erreicht, die das Phänomen von *Gene Silencing* durch die RNAi-Interferenz ausnutzt. Mit Hilfe des *StSUT4*-RNAi Vektors wurden Kartoffeln der Varietät Désirée, sowie Tomatenpflanzen transformiert (Chincinska *et al.*, 2008, Boldt *et al.* unpubliziert). Im Fall der Tomaten war eine erfolgreiche Inhibierung des orthologen *SUT4* Gens aufgrund der hohen Sequenzhomologie zwischen *LeSUT4* und *StSUT4* 97% Identität zu erwarten. Die Pflanzen, deren Genom erfolgreich transformiert wurde, wurden hinsichtlich der endogenen *SUT4*-Expression untersucht. Für die *SUT4*-Expressionsanalysen wurden reife Blüten der Transformanten und Wildtyp Kontrollpflanzen ausgewählt. Das Blütenmaterial wurde am Nachmittag gegen 15 Uhr geerntet.

Von 72 Pflanzen der Kartoffelvarietät Désirée, die aus Kallusgewebe regeneriert wurden, tragen 51 Pflanzen das gewünschte Transgen wie durch PCR-Analyse gezeigt wurde (ungezeigt). Davon wurden 41 Pflanzen der Analyse des *SUT4*-Expressionsniveaus unterzogen. Es wurden 10 unabhängige transgene Linien von Kartoffelpflanzen mit signifikant reduzierter *SUT4*-Expression über *real time* PCR identifiziert (Abb. 4 A)

212 Tomatenpflanzen wurden aus dem mit *StSUT4*-RNAi transformierten Kallusgewebe regeneriert. Im Genom von 38 Pflanzen wurde das Transgen nachgewiesen (ungezeigt). Bei 7 unabhängigen transgenen *StSUT4*-RNAi Tomatenlinien wurde mittels der qPCR eine signifikante Expressionsreduktion von *SUT4* nachgewiesen (Abb. 4 B).

### **4.3 *StSUT4* Expression in *StSUT4*-RNAi Kartoffeln**

#### **4.3.1 *Source*-Blätter**

Die Veränderungen des mRNA-Gehalts in *Source*-Blättern im Laufe des Tages wurden untersucht (Abb. 5). Das *SUT4* in *Source*-Blättern der *StSUT4*-RNAi Linien war jedoch kaum exprimiert und in der Nacht nicht mehr nachweisbar. Demzufolge wurde auch keine Oszillation

der *SUT4*-Expression in den transgenen Linien zu erkennen. Auch keine signifikanten *SUT4*-Expressionreduktion in den *StSUT4*-RNAi *Source*-Blättern im Vergleich zum WT wurde nachzuweisen (Abb. 5 A).

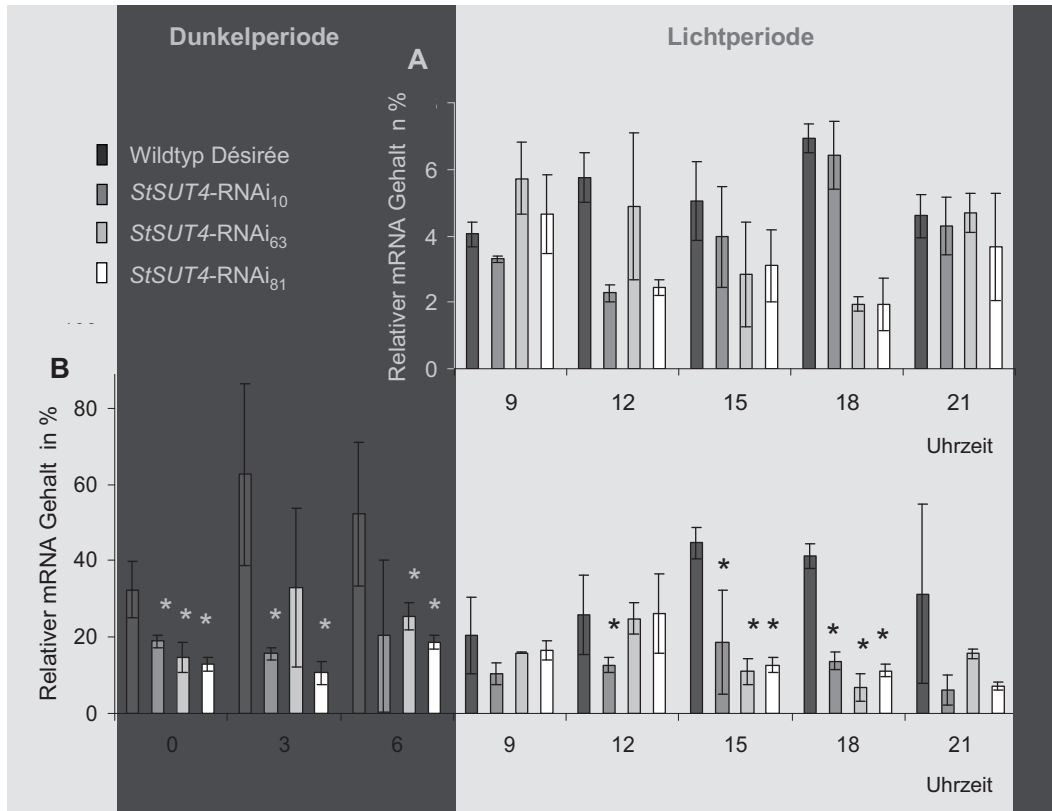


Abb. 5 Quantitative Analysen von *SUT4* Expressionsveränderungen bei den *StSUT4*-RNAi und Wildtyp-Désirée Kartoffelpflanzen im Langtag A. *Source*-Blätter B. Blüten. Mittelwerte  $\pm$  SD von 3-5 Proben, von mindestens 3 Pflanzen wurden dargestellt. Die signifikanten Unterschiede zwischen transgenen und Wildtyp Pflanzen wurden als (\*) für  $p < 0,05$  bezeichnet. Eine unterschiedliche Skalierung wurde angewendet.

#### 4.3.2 Blüten

Ähnlich wie in Wildtyp-*Source*-Blättern wurde die Oszillation der *StSUT4*-Expression auch in Kartoffelblüten beobachtet (Abb. 5 B). Jedoch im Blütengewebe wurde die stärkste Reduktion der *SUT4*-mRNA-Akkumulation am Anfang der Lichtperiode und die maximale Transkriptionakkumulation in der Nacht festgestellt. Im Fall des Blütengewebes von 3 untersuchten *StSUT4*-RNAi-Désirée Linien war keine diurnale Oszillation der *SUT4*-Expression mehr zu

beobachten. In den Blüten von *StSUT4*-RNAi-Kartoffelpflanzen wurde die signifikante Reduktion der *SUT4*-Transkriptakkumulation im Vergleich zum Wildtyp festgestellt.

#### 4.4 *SUT1* und *SUT2* Transkriptgehalt in *StSUT4*-RNAi Kartoffeln

Um zu prüfen, ob der bei *StSUT4*-RNAi Kartoffelpflanzen beobachtende Phänotyp tatsächlich durch die Inhibition der *SUT4*-Expression ausgelöst wird oder vielleicht durch veränderte Expression von anderen Saccharosetransportern verursacht wurde, wurden Veränderungen der Transkriptgehalte von *SUT1* und *SUT2* im Tagesverlauf analysiert (Abb. 6).

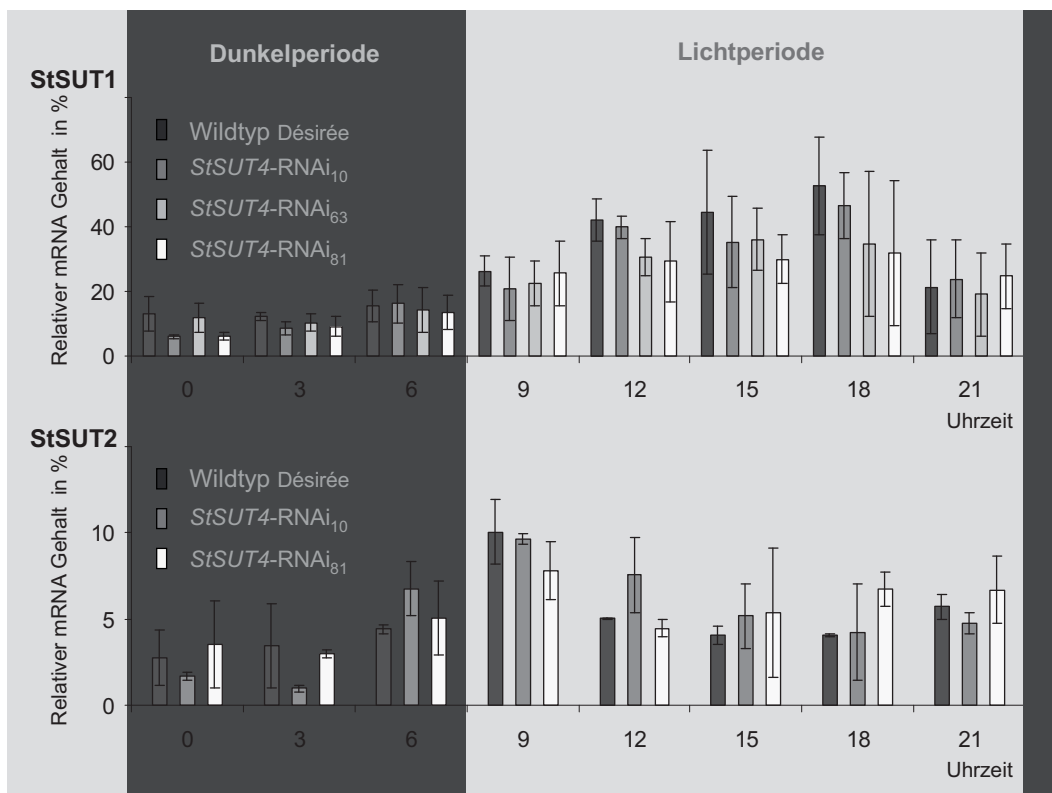


Abb. 6 Quantitative Analyse der *SUT4*-mRNA-Konzentrationsänderungen der Saccharosetransporter *SUT1* und *SUT2* in den *Source*-Blättern von *StSUT4*-RNAi und Wildtyp-Désirée im Langtag A. *StSUT1* B. *StSUT2*. Mittelwerte  $\pm$  SD von 3-5 Proben, von mindestens 3 Pflanzen sind dargestellt. Unterschiedliche Skalierung wurde angewendet

Analyse der Transkriptakkumulation von *StSUT1* und *StSUT2* in *StSUT4*-RNAi Kartoffeln über eine Periode von 24h sollte auch indirekt nachweisen, ob das zur Inhibition der *SUT4*-Expression verwendete RNAi-Konstrukt spezifisch war. Die Quantifizierung des relativen Transkriptgehalts der Saccharosetransporter SUT1 und SUT2 bei reduzierter *SUT4*-Expression zeigte keine signifikanten Veränderungen im Vergleich zu der Wildtyp-Kontrolle.

## 4.5 Phänotyp von *StSUT4*-RNAi-Kartoffelpflanzen

### 4.5.1 Äußeres Erscheinungsbild

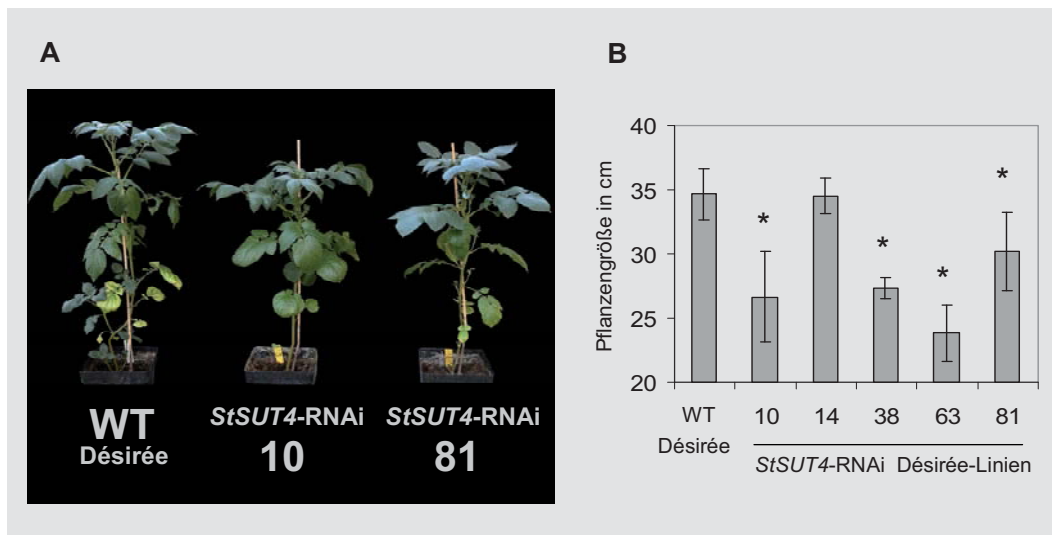


Abb. 7 Phänotyp von *SUT4*-RNAi Désirée Kartoffelpflanzen im Vergleich zum Wildtyp Désirée A. 3-Wochen alte Pflanzen der Linien 10 und 81 und Wildtyp. B. *StSUT4*-RNAi Désirée-Pflanzen wurden meistens kleiner als die Wildtyp-Kontrolle. Gemittelte Werte  $\pm$  SD aus 3 unabhängigen Experimenten, in denen  $n > 3$  wurden dargestellt. Die signifikanten Unterschiede zwischen transgenen und Wildtyp Pflanzen wurden als (\*) für  $p < 0,05$  bezeichnet. Die bunte Abbildungsversion im Anhang.

Das Aussehen von jungen transgenen Kartoffelpflanzen (3-4Woche alte Pflanzen, die noch keine sichtbaren Blütenknospen zeigten) mit einer reduzierten *SUT4*-Expression unterschied sich nur wenig vom Wildtyp Désirée gleichen Alters. Meistens waren jedoch die transgenen Pflanzen dichter und etwas kleiner als die WT-Kontrollpflanzen (Abb. 7 A).

Statistische Analyse der Größe von 5 Wochen alten Pflanzen hat signifikante Unterschiede gezeigt (Abb. 7 B). Von 5 untersuchten *StSUT4*-RNAi-Kartoffellinien waren 4 Linien: (10, 38, 63 und 81) signifikant kleiner als die WT-Kontrolle. Die gesamte Blattzahl (also auch die Anzahl von Internodien) der jungen Pflanzen war jedoch für die *StSUT4*-RNAi Linien und den Wildtyp vergleichbar (Abb. 8 A).

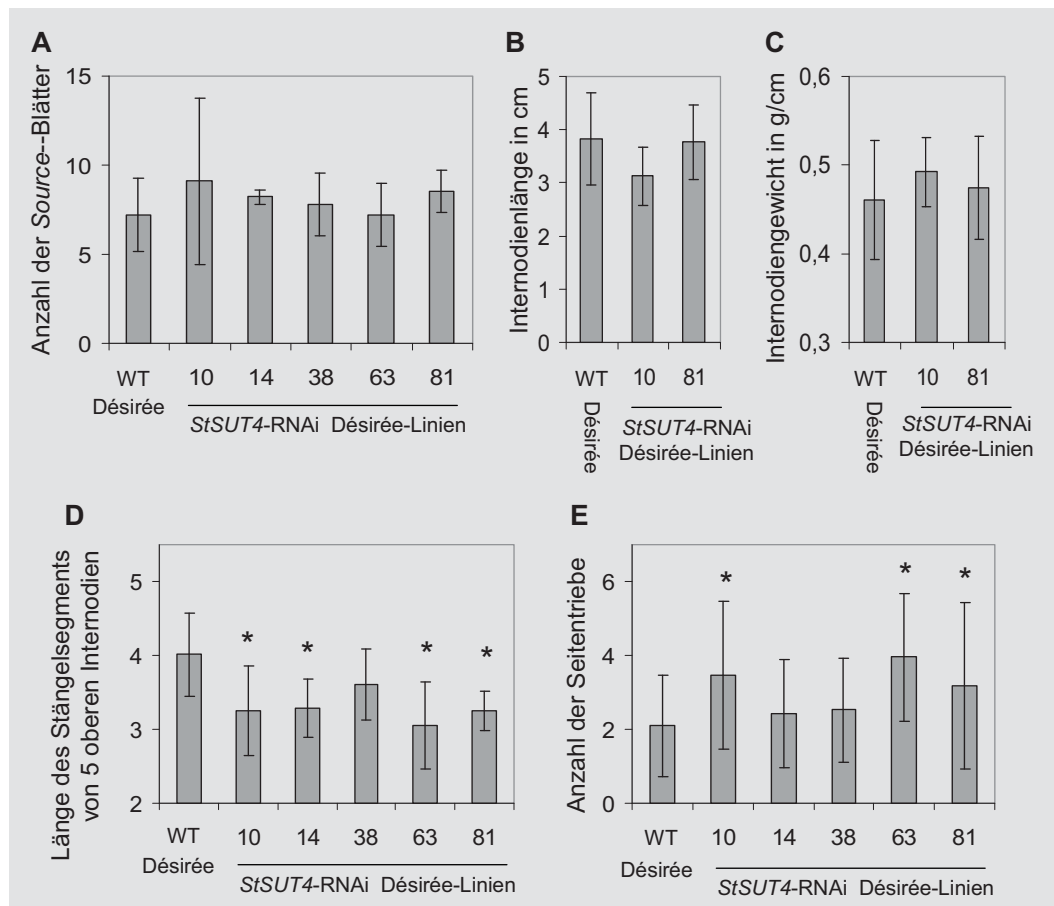


Abb. 8 Phänotyp der *StSUT4*-RNAi Kartoffelpflanzen im Vergleich zum Wildtyp A. gesamte Anzahl von *Source*-Blättern B. Länge und C. Gewicht der siebten und achten Internode D. Länge des Abschnitts von 5 oberen Internodien E. Anzahl von Seitentrieben. In Diagrammen A. und D wurden 3-4 Wochen alte Pflanzen analysiert, die noch keine sichtbaren Blütenknospen besaßen. In den Graphiken B, C und E wurden 10wöchige, blühende Pflanzen analysiert. Gemittelte Werte  $\pm$  SD aus 3 unabhängigen Experimenten, in denen  $n \geq 3$ , wurden dargestellt. Die signifikanten Unterschiede zwischen transgenen und Wildtyp Pflanzen wurden als (\*) für  $p < 0,05$  bezeichnet.

Um zu klären, ob die Unterschiede in der Pflanzengröße durch Verkürzung der Internodien von *StSUT4*-RNAi Pflanzen verursacht sind, wurden Untersuchungen der Internodien-Länge

vorgenommen. Die siebten und achten Internodien von oben wurden für die Länge- und Biomasse-Bestimmung ausgewählt. Es wurden jedoch keine signifikante Unterschiede zwischen *StSUT4*-RNAi und WT Kartoffel gezeigt (Abb. 8 B und C).

Als bessere Methode für die Internodien-Länge-Bestimmung zeigte sich die Messung des Abschnitts der 5 jüngsten Internodien, in denen der Wachstumsprozess noch nicht beendet ist (Martinez-Garcia *et al.* 2002). Die Analyse der jüngsten Stängelsegmente der *StSUT4*-RNAi Désirée Pflanzen zeigten eine signifikante Verkürzung der Internodien-Länge aller analysierten transgenen Kartoffellinien im Vergleich zum Wildtyp (8 D).

Die Pflanzen mit einer verminderten *SUT4* Expression waren kompakter als die Wildtypkontrolle. Um diese Eigenschaft zu analysieren, wurde die Anzahl von Seitentrieben der *StSUT4*-RNAi und Wildtyp-Kartoffel bestimmt (Abb. 8 E). Im Fall der Linien *StSUT4*-RNAi<sub>10</sub>, *StSUT4*-RNAi<sub>63</sub> und *StSUT4*-RNAi<sub>81</sub> wurde eine signifikant erhöhte Anzahl von Seitentrieben im Vergleich zum WT nachgewiesen. Die Faktoren, die bei verschiedenen Pflanzenarten die Veränderungen der Internodienlänge, der Pflanzengröße sowie auch des Wachstums von Seitentrieben verursachen, können auch die Ausprägung der Blätter beeinflussen (Kozuka *et al.* 2005; Martinez-Garcia *et al.* 2002a). Transgene Blätter, die dunkelgrün waren, also normal und gesund aussahen, haben jedoch nur subtile morphologische Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp gezeigt (Daten nicht präsentiert).

#### **4.5.2 Blühverhalten**

Weitere Veränderungen wurden in den *StSUT4*-RNAi Pflanzen während des Übergangs von vegetativer zur generativen Entwicklungsphase beschrieben. *StSUT4*-RNAi Pflanzen bildeten 4-6 Tage früher Blütenknospen als WT Pflanzen. Das Aussehen der Knospen sowie auch der ganzen Blütenstände von transgenen Pflanzen war im Vergleich zum WT unverändert. Unverändert waren auch die Anzahl der Knospen und die Dauer der Blütenentwicklung aus den Knospen (Abb. 9 A und B). Infolge des früheren Übergangs der *StSUT4*-RNAi Kartoffelpflanzen von vegetativer zu generativer Entwicklungsphase beginnen die Pflanzen mit der



reduzierten *SUT4*-Expression früher als vergleichbare Wildtyp-Pflanzen zu blühen (Abb. 4.5.2 C).

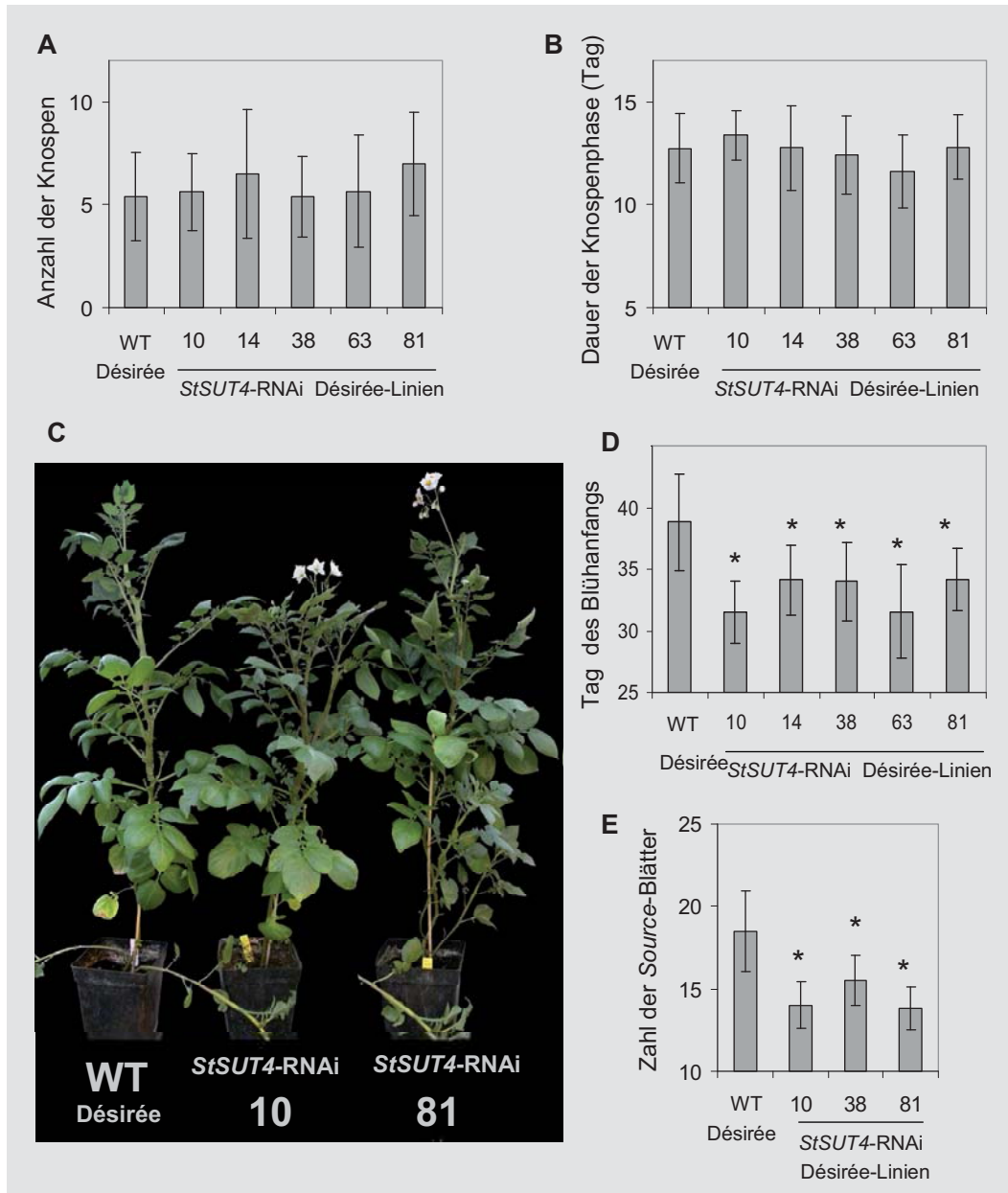


Abb. 9 Analyse des Phänotyps der *St SUT4*-RNAi und Wildtyp Désirée Kartoffel in generativer Entwicklungsphase unter LD-Bedingungen A. Durchschnittliche Anzahl der Blütenknospen B. Entwicklungsdauer von Blüten aus Knospen C. frühblühende, sieben Woche alte *StSUT4*-RNAi Désirée-Pflanzen der Linien *StSUT4*-RNAi<sub>10</sub> und *StSUT4*-RNAi<sub>81</sub> im Vergleich zum Wildtyp D. Tag des Aufblühens E. Anzahl von *Source*-Blätter der blühenden Pflanzen. Mittelwerte  $\pm$  SD von 3 Experimenten ( $n \geq 5$ ) wurden dargestellt. Die signifikanten Unterschiede zwischen transgenen und Wildtyp Pflanzen wurden als (\*) für  $p < 0,05$  bezeichnet. Eine unterschiedliche Skalierung wurde angewendet.

Die ersten Blüten erscheinen bei den transgenen Pflanzen durchschnittlich 4-6 Tage vor dem Wildtyp-Erblühen (Abb. 9 D). In der reproduktiven Entwicklungsphase war auch signifikante Reduktion der Zahl von *StSUT4*-RNAi Blätter auf dem blühenden Stängel im Vergleich zum Wildtyp zu beobachten (Abb. 9 E). Das frühere Blühen der transgenen Pflanzen wurde also mit der Anzahl von *Source*-Blättern korreliert. Im Aussehen der Einzelblüte von *StSUT4*-RNAi Kartoffeln wurde kein Unterschied in der Blütenform, Farbe und Größe im Vergleich zu den WT festgestellt.

### 4.5.3 Knollenphänotyp

Nach 3 Monaten Anzucht der Kartoffelpflanzen im LT erfolgten die Analysen des Knollenertrags. Keine Unterschiede in der Morphologie der transgenen und Wildtyp-Knollen wurden festgestellt (zu sehen im Kapitel 4.12.1; Abb. 25 A als „Kontrolbedingungen“). Das gesamte Knollengewicht pro Pflanze im Fall von 5 analysierten *StSUT4*-RNAi Linien war hingegen signifikant höher als bei den Wildtyp-Pflanzen (Abb. 10 A) aber die Knollenanzahl in den transgenen Pflanzen war unverändert (Abb. 10 B).

Eine große Bedeutung für die Masse der Knolle hat der Stärkegehalt, der mit der Knollendichte korreliert (Leggiewie, 1996). Zwei Parameter, Gewicht und Volumen jeder Knolle wurden gemessen und die Dichte aus der Formel:  $\text{Dichte} = \text{Masse} / \text{Volumen}$  berechnet und auf diese Weise wurde der relative Stärkegehalt in den Knollen bestimmt (Abb. 10 C). Im Fall der Linien *StSUT4*-RNAi<sub>10</sub> und *StSUT4*-RNAi<sub>14</sub> wurde ein signifikant erhöhter Stärkegehalt festgestellt.

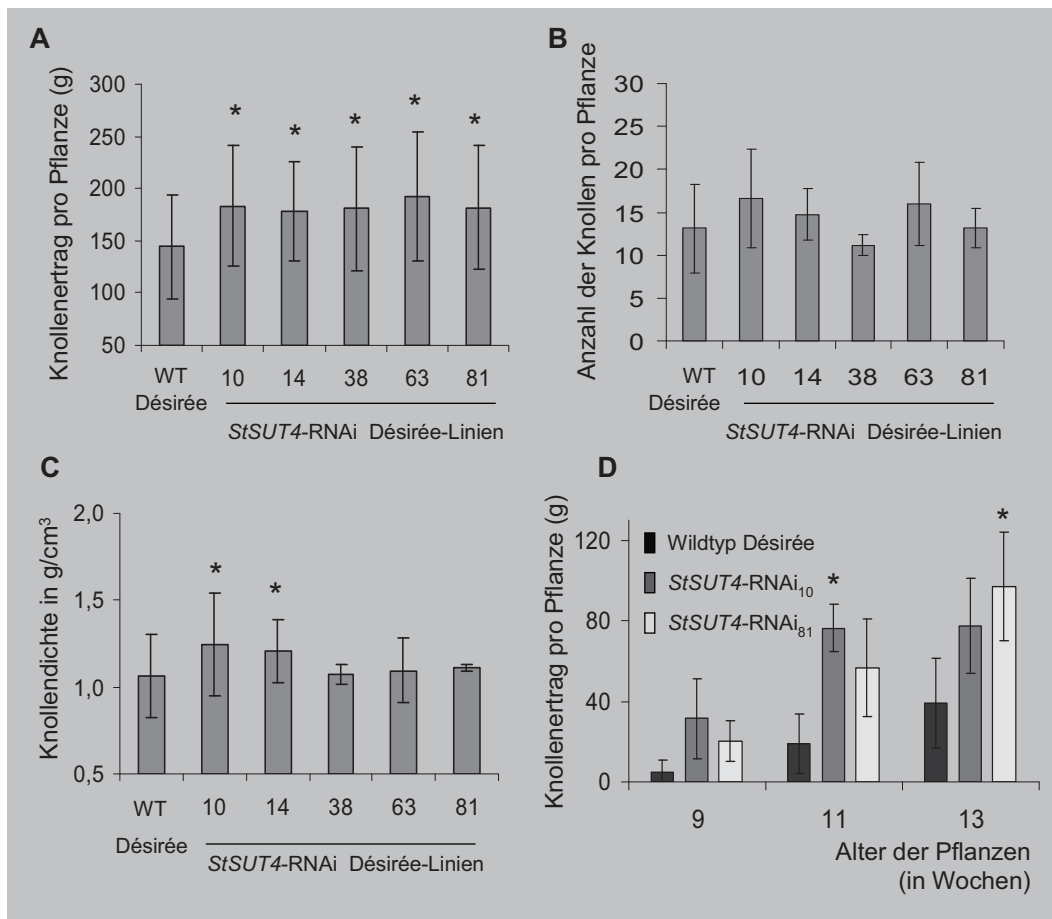


Abb. 10 Analysen des Knollenertrags von *StSUT4-RNAi* und Wildtyp Pflanzen im LT A. Knollengewicht pro Pflanze B. Anzahl der Knollen pro Pflanze. Gemittelte Werte  $\pm$  SE aus 3 unabhängigen Experimenten, in deren  $n \geq 5$  wurden dargestellt C. Knollendichte D. Vergleich des Knollenertrags von 9, 11 und 13-Wochen alten Pflanzen. Gemittelte Werte  $\pm$  SD ( $n=3$ ) von einem repräsentativen Experiment wurden dargestellt. Die Ergebnisse wurden in 3 unabhängigen Experimenten bestätigt. Die signifikanten Unterschiede zwischen transgenen und Wildtyp Pflanzen wurden als (\*) für  $p < 0,05$  bezeichnet. Eine unterschiedliche Skalierung wurde angewendet.

Um festzustellen, ob der erhöhte Knollenertrag von *StSUT4-RNAi* Kartoffelpflanzen mit einer früheren Knolleninitiation oder schnellerem Knollenwachstum verbunden ist, wurde die Analyse der Gewicht-Veränderungen im Laufe der Knollenentwicklung vorgenommen. Knollenertrag von 9, 11 und 13-Wochen alten Pflanzen von transgenen und WT Linien die im LT wuchsen, wurden verglichen (Abb. 10 D). Die *StSUT4-RNAi* Linien präsentierten in jedem untersuchten Alter einen erhöhten Knollenertrag im Vergleich zum WT. Für die 11-Wochen alten Pflanzen von der Linie *StSUT4-RNAi*<sub>10</sub> und die 13-Wochen alten Pflanzen der Linie *StSUT4-RNAi*<sub>81</sub> wurde ein signifikant höherer Knollenertrag als bei den Wildtyp Pflanzen in gleichem Alter festgestellt.

## 4.6 Analyse des Kohlenhydratgehalts in *Source*-Blättern

Veränderungen im Kohlenhydrat-Metabolismus der Pflanzen gingen mit Unter- sowie Überexpression von verschiedenen Saccharosetransportern einher (Riesmeier *et al.*, 1994; Kühn *et al.*, 1996; Leggewie, 1996; Bürkle *et al.*, 1998; Hackel *et al.*, 2006; Gottwald *et al.*, 2000; Leggewie *et al.*, 2003). Die Untersuchungen des Kohlenhydratgehalts in verschiedenen Organen von *SUT4*-RNAi- und Wildtyp-Kartoffeln vorgenommen.

### 4.6.1 Bestimmung löslicher Zucker in *Source*-Blättern

Die Zeit-abhängigen Veränderungen des Kohlenhydratgehalts in den *Source*-Blättern von *SUT4*-RNAi- und Wildtyp Kartoffeln im LT wurden untersucht. Die Analysen wurden in der Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Peter Geigenberger (Max Planck Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie, Potsdam-Golm) durchgeführt.

Am Anfang des Tages wurden keine signifikanten Unterschiede im Gehalt der löslichen Zucker zwischen Wildtyp und transgenen Pflanzen beobachtet (Abb. 11). Während der Gehalt an Glukose, Fruktose und Saccharose im Laufe des Tages im Wildtyp deutlich stieg und gegen Nachmittag das Maximum erreichte, blieb der Gehalt von löslichen Zuckern gegen Nachmittag in *Source*-Blättern von *StSUT4*RNAi Pflanzen unverändert. Entsprechend war der Gehalt an löslichen Zuckern gegen 15 Uhr im Wildtyp signifikant höher als in den *StSUT4*-RNAi Pflanzen. Erst am Ende der Lichtperiode wurde eine deutliche Steigerung des Zuckergehaltes in *StSUT4*-RNAi *Source*-Blättern im Unterschied zum Wildtyp festgestellt. Beim WT wurde dagegen eine Reduktion des Zuckergehalts in den *Source*-Blättern am Ende des Tages beobachtet. Um 21 Uhr waren die Werte für Zuckergehalte in *StSUT4*-RNAi *Source*-Blättern meistens signifikant höher als die Werte für die entsprechenden Wildtypkontrolle.

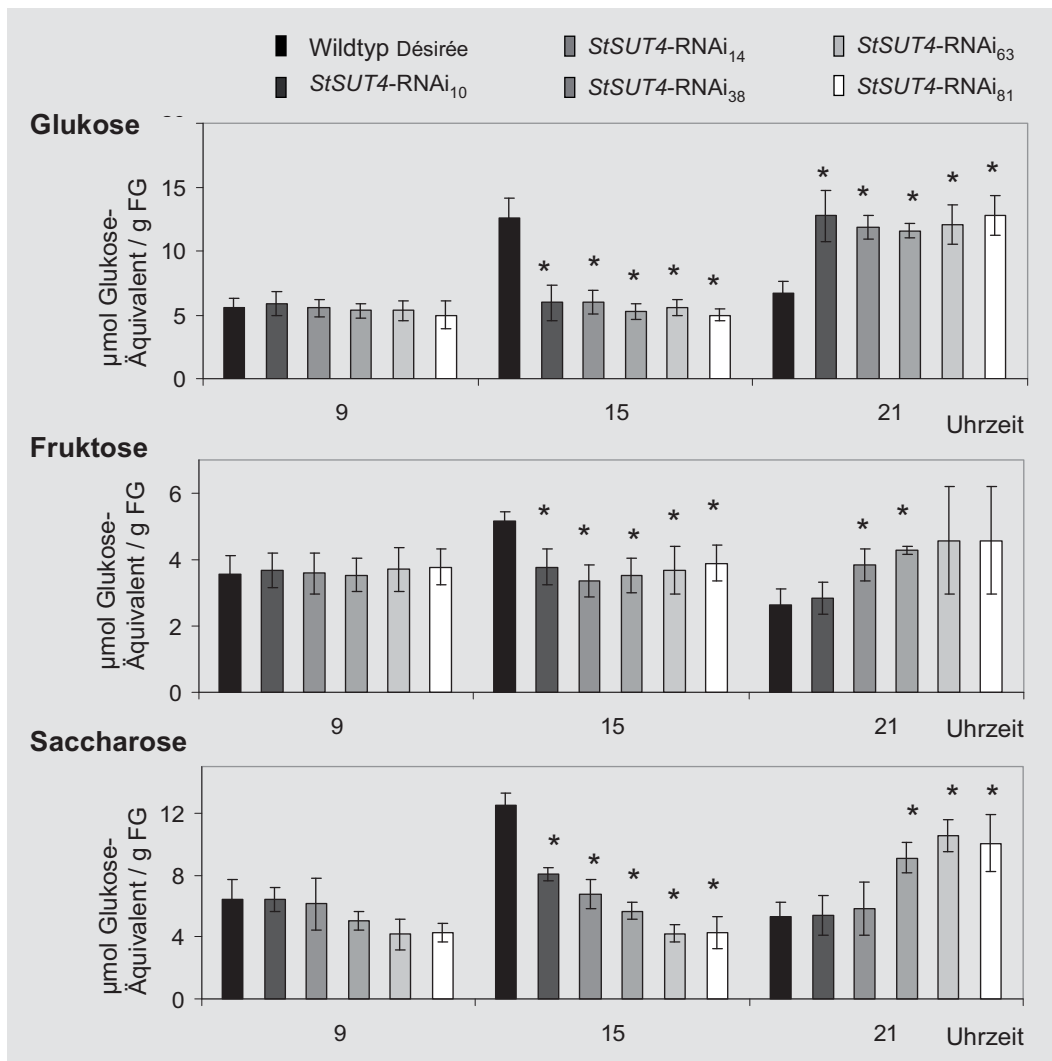


Abb. 11 Enzymatische Bestimmung der löslichen Zucker in *Source*-Blättern von *StSUT4-RNAi* und WT Désirée Pflanzen im LT. Die Analysen fassten 3 Zeitpunkte der Lichtperiode um. Es wurden gemittelte Werte  $\pm$  SD (n=3) von einem repräsentativen Experiment dargestellt. Die Ergebnisse wurden in 2 unabhängigen Experimenten bestätigt. Die signifikanten Unterschiede zwischen transgenen und Wildtyp Pflanzen wurden als (\*) für  $p < 0,05$  bezeichnet. Eine unterschiedliche Skalierung wurde angewendet.

#### 4.6.2 Stärke-Gehalt

Um Unterschiede zwischen Stärke-Gehalten in *StSUT4-RNAi*- und Wildtyp Désirée zu zeigen wurde die Methode der Stärke-Färbung mit Lugol'scher Lösung (Iod/Kalium-Iodid-Färbung) angewendet. Die *Source*-Blätter wurden mit Alufolie über Nacht abgedeckt. Die Abdeckung stellt sicher, dass es nicht in den ausgewählten Blättern zur Aktivierung der photosynthetischen Prozesse zu Beginn der Lichtperiode kommt. Die abgedeckten Blätter sowie auch ver-

gleichbare unabgedeckte Kontrollblätter wurden am Morgen um 10 Uhr (4h nach dem Anfang der Lichtperiode, LT-Bedingungen) analysiert.

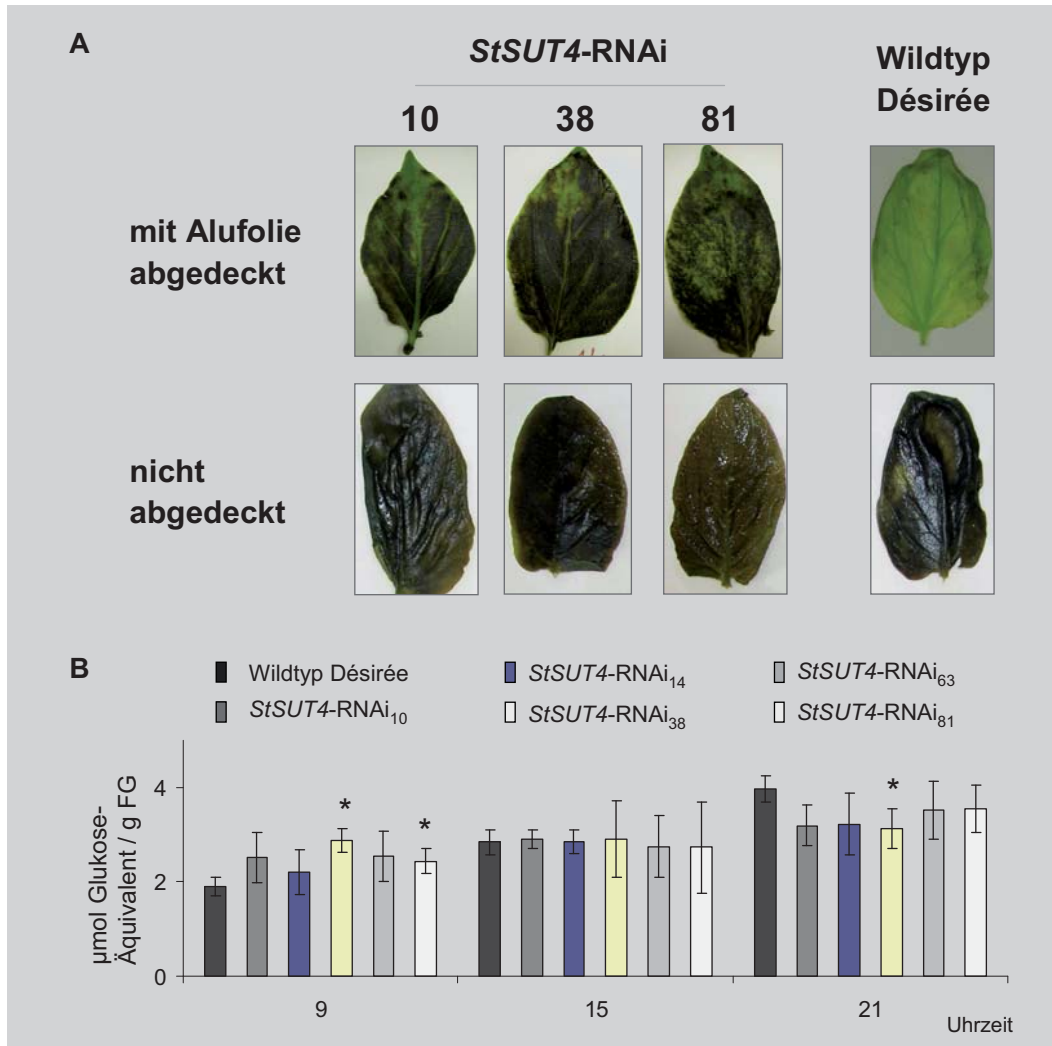


Abb. 12 Qualitative und quantitative Bestimmung des Stärkegehalts in *StSUT4*-RNAi und Wildtyp *Source*-Blättern im LT A. Die über Nacht mit Alufolie abgedunkelten Blättchen (oben) sowie auch die nicht-abgedunkelten Kontrollblättchen (unten) nach Stärkefärbung. Das Blattmaterial wurde um 10 Uhr (4 Stunden nach Beginn der Lichtperiode) aufgenommen B. Enzymatische Bestimmung des Stärke-Gehalts, die 3 Zeitpunkte der 16h Lichtperiode umfassten. Es wurden gemittelte Werte  $\pm$  SD (n=3) von einem repräsentativen Experiment dargestellt. Die Ergebnisse wurden in 2 unabhängigen Experimenten bestätigt. Die signifikanten Unterschiede zwischen transgenen und Wildtyp Pflanzen wurden als (\*) für  $p < 0,05$  bezeichnet.

Nach der Stärke-Färbung zeigte es sich, dass die abgedeckten *StSUT4*-RNAi Blätter mehr Stärke als WT akkumuliert haben und dadurch nach der Färbung dunkler als abgedeckte WT

Blätter waren (Abb. 12 A). Zwischen unabgedeckten Blättern der *StSUT4*-RNAi Linien und unabgedeckten WT Blättern wurden keine solchen Unterschiede beobachtet. Die enzymatische quantitative Bestimmung des Stärke-Gehalts in WT *Source*-Blättern hat ein signifikant erhöhter Gehalt von Stärke am Anfang des Tages in *Source*-Blättern von transgenen Linien *StSUT4*-RNAi<sub>38</sub> und *StSUT4*-RNAi<sub>81</sub> gezeigt (Abb. 12 B). In allen Blättern, die um 15 Uhr genommen wurden, war der Stärkegehalt vergleichbar. Am Ende des Tages wurde mehr Stärke in Wildtyp Blättern als in Blättern von *StSUT4*-RNAi Pflanzen festgestellt. Linie *StSUT4*-RNAi<sub>38</sub> zeigte am Abend signifikant weniger Stärke in Blättern als WT.

## 4.7 Saccharose-Efflux

Die zeitlichen Veränderungen im Kohlenhydratprofil der *StSUT4*-RNAi Kartoffel-*Source*-Blättern können auf eine Störung im Saccharoseexport aus *Source*-Blättern hinweisen. Um es zu prüfen wurde eine indirekte Methode der Saccharose-Efflux-Bestimmung, die auf der Messung des Saccharosegehalts in Phloemexudaten von *Source*-Blättern beruht, gewählt. Die zeitlichen Veränderungen der Saccharosekonzentration in Phloemexudaten sollten mit dem Tagesverlauf des Saccharoseexports von *Source*-Blättern korrelieren.

Die Amplitude der Werte des Zucker-Efflux im Tagesverlauf von *StSUT4*-RNAi Pflanzen war wesentlich höher im Vergleich zum WT (Abb 13). Am Anfang der Lichtperiode war die Effluxrate von 2 transgenen Linien, *StSUT4*-RNAi<sub>10</sub> und *StSUT4*-RNAi<sub>38</sub>, signifikant niedriger als beim WT. Im Laufe des Tages wurde bei *StSUT4*-RNAi Pflanzen ein schneller Anstieg des Saccharose-Efflux beobachtet, so dass gegen Mitte des Tages die Efflux-Rate von transgenen und WT Pflanzen das gleiche Niveau erreichten. Die Effluxrate von *StSUT4*-RNAi Pflanzen sowie auch der WT Kontrolle erreichte das Maximum am Nachmittag. Jedoch war der maximale Efflux bei transgenen Linien *StSUT4*-RNAi<sub>10</sub> und *StSUT4*-RNAi<sub>63</sub> signifikant höher, als im WT. Am Ende des Tages wurde die Verminderung der Efflux-Rate in allen analysierten Pflanzen beobachtet. Jedoch war der Efflux von transgenen Linien: *StSUT4*-RNAi<sub>10</sub>, *StSUT4*-RNAi<sub>63</sub> und *StSUT4*-RNAi<sub>81</sub> signifikant höher als in der WT Kontrolle.

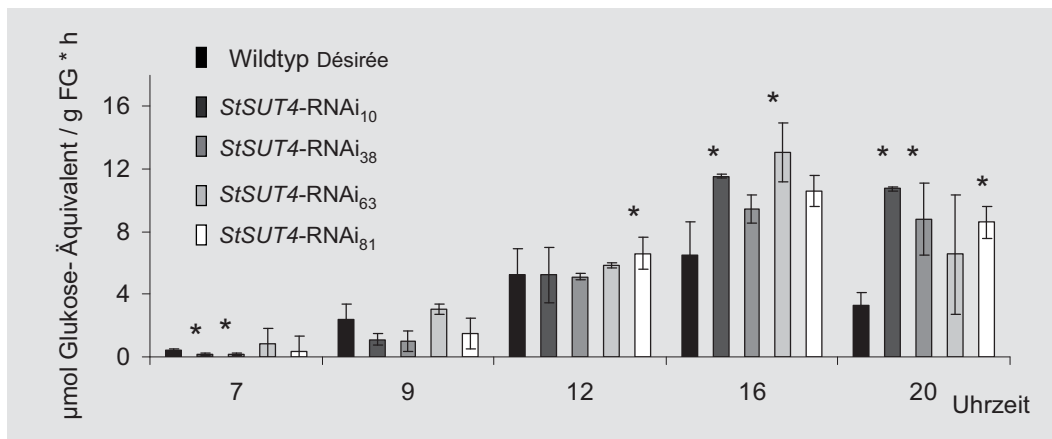


Abb. 13 Verlauf des Saccharoseexports von *StSUT4-RNAi* und Wildtyp *Source*-Blättern im Laufe der LT-Lichtperiode. Die auf der X-Achse dargestellte Uhrzeit bezeichnet den Moment der Messung von Phloemexudaten, die in der jeweils vorhergehenden Stunde gesammelt wurden. Es wurden die Werte  $\pm$  SD (n=3) von einem repräsentativen Experiment dargestellt. Die Ergebnisse wurden in 2 unabhängigen Experimenten bestätigt. Die signifikanten Unterschiede zwischen transgenen und Wildtyp-Pflanzen wurden als (\*) für  $p < 0,05$  bezeichnet.

#### 4.8 Kohlenhydratbestimmung in *Sink*-Blättern

Die *Sink*-Blätter von jungen transgenen und Wildtyp Pflanzen wurden verwendet, um den Einfluss von verminderter *SUT4*-Expression auf den Kohlenhydrategehalt in *Sink*-Organen zu analysieren.. Das Blattmaterial wurde gegen Mitte des Tages zwischen 14 und 15 Uhr geerntet. Die Kohlenhydratbestimmung hat in *StSUT4-RNAi* Kartoffeln keine signifikanten Veränderungen im Vergleich zum Wildtyp gezeigt (Abb 14).



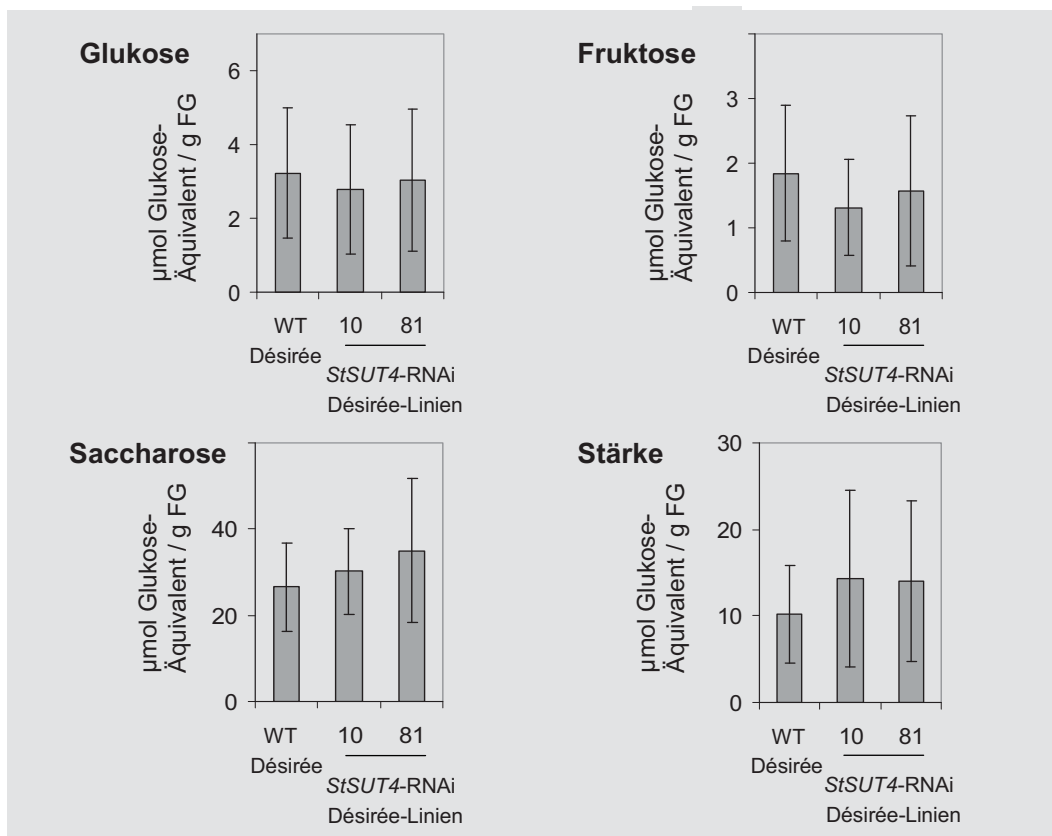


Abb. 14: Enzymatische Bestimmung von Kohlenhydratgehalten in *Sink*-Blättern von *StSUT4*-RNAi und Wildtyp Désirée-Pflanzen unter LT-Bedingungen. Es wurden gemittelte Werte  $\pm$  SD (n=3) von einem repräsentativen Experiment dargestellt. Die Ergebnisse wurden in 2 unabhängigen Experimenten bestätigt. Eine unterschiedliche Skalierung wurde angewendet.

## 4.9 Kohlenhydratbestimmung in *Sink*-Knollen

Die Durchführung von Vergleichsanalysen des Knollenmetabolismus ist problematisch, wegen der unsynchronisierten Entwicklung der Organe (Fernie und Willmitzer 2001). Im Experiment wurde die Knollengröße als Kriterium für die Probenauswahl gewählt. Die 100mg Stücke des vaskulären Speicherparenchyms von 2cm großen Knollen wurden für die enzymatische Zuckerbestimmung präpariert. Nur im Fall der Linie *StSUT4*-RNAi<sub>63</sub> wurde eine signifikante Reduktion des Glukosegehalts und eine signifikante Erhöhung des Fruktosegehalts festgestellt (Abb 15). In Knollen der Linie *StSUT4*-RNAi<sub>81</sub> wurde eine signifikante Erhöhung des Stärkegehalts gezeigt.

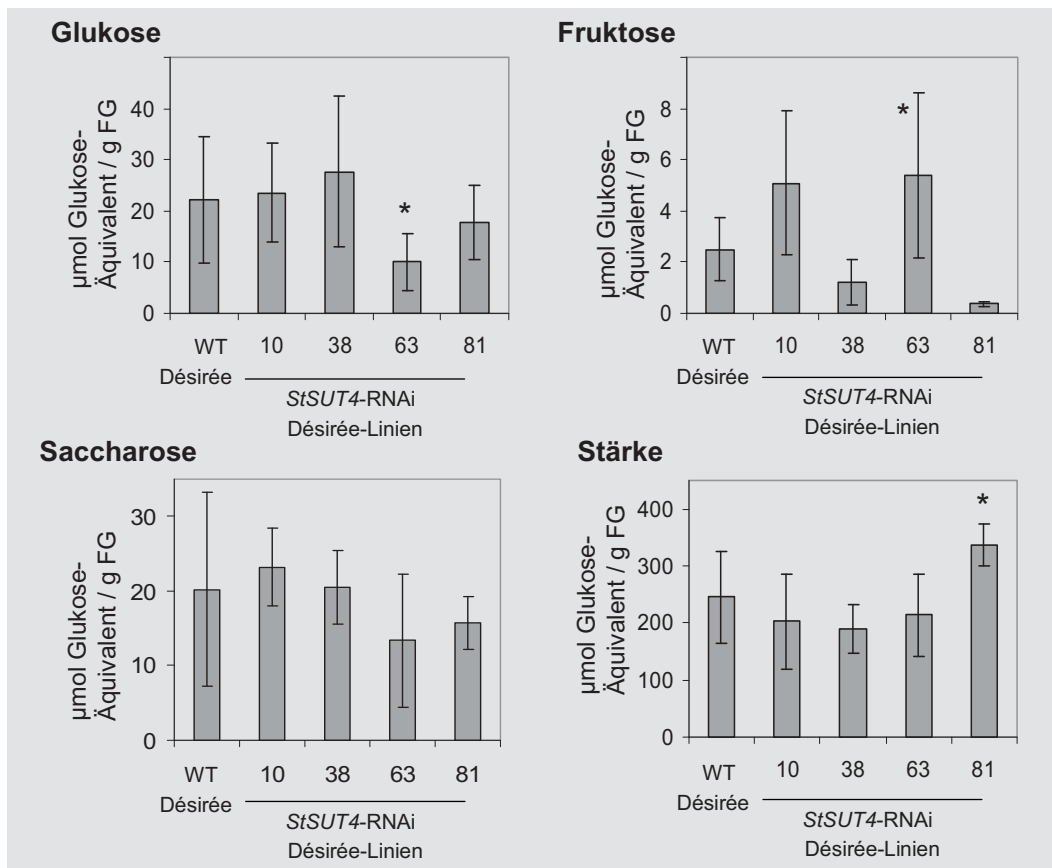


Abb. 15: Enzymatische Bestimmung von Kohlenhydratgehalten in 2 cm Knollen von *StSUT4*-RNAi und Wildtyp Désirée-Pflanzen, die unter LT-Bedingungen im Gewächshaus wuchsen. Es wurden gemittelte Werte  $\pm$  SD von 3 unabhängigen Experimenten ( $n > 3$ ) dargestellt. Die signifikanten Unterschiede zwischen transgenen und Wildtyp Pflanzen wurden als (\*) für  $p < 0,05$  bezeichnet. Eine unterschiedliche Skalierung wurde angewendet.

## 4.10 Analyse von *in vitro* Knollen

### 4.10.1 Herstellung der Mikroknollen

Um die Schwierigkeiten in den Analysen des Materials aus *in vivo* hergestellten Knollen zu vermeiden, wurde für die weiteren Untersuchungen mit dem System der *in vitro* Knollenerzeugung gearbeitet. Für die Optimierung der *in vitro* Knolleninduktion wurden 3 verschiedene MS-Medium-Varianten, 5, 8 und 10MS, mit erhöhten Saccharosekonzentrationen (entsprechend 5, 8 und 10% w/v) getestet. Die Mikroknollenbildung erfolgte innerhalb von 10 Tagen

im Dunkeln (Abb. 16). Nach 20 Tagen wurde die Effektivität der Knollenherstellung ausgewertet und als % der Stecklinge, die Knollen gebildet haben, dargestellt (Abb. 17).

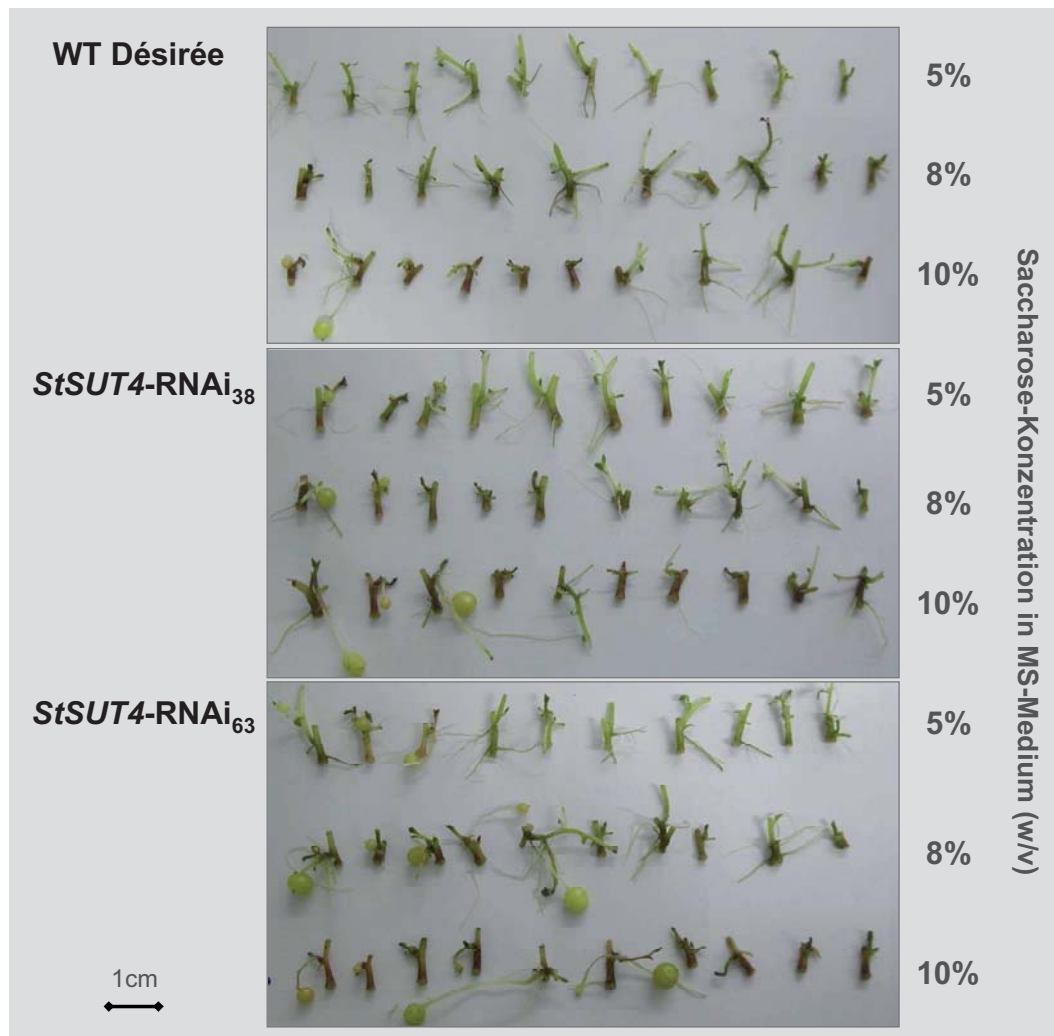


Abb. 16: Induktion von *in vitro* Knollen aus Stecklingen von 2 *StSUT4*-RNAi Linien und Désirée Wildtyp-Pflanzen. Für jede Kartoffellinie wurden Stecklinge von einem repräsentativen Kulturbecher für jede Variante von MS Medium (5, 8 oder 10% (w/v) Saccharosekonzentration) dargestellt. Das Bild wurde 10 Tage nach dem Transfer der Gewebekultur ins Dunkel aufgenommen. Die Ergebnisse wurden in 3 unabhängigen Experimenten bestätigt.

Transgene Pflanzen auf 8MS Medium zeigten signifikant erhöhte Knollenherstellungseffektivität im Vergleich zu der Anzucht auf 5MS, sowie auch zum WT auf 8MS. Die höchste Knollenherstellungseffektivität (~60%) von allen untersuchten Linien wurde auf Medium mit 10% Saccharose beobachtet.

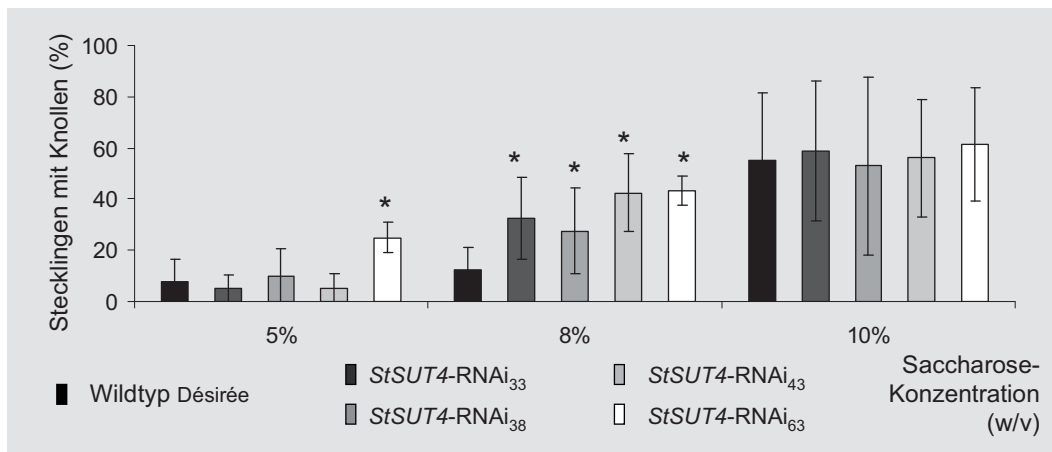


Abb. 17: Abhängigkeit der *in vitro* Knollenbildungs-Effektivität von der Saccharosekonzentration. Es wurden gemittelte Werte  $\pm$  SD ( $n > 7$ ) von einem repräsentativen Experiment dargestellt. Die Ergebnisse wurden in 2 unabhängigen Experimenten bestätigt. Die signifikanten Unterschiede zwischen transgenen und Wildtyp Pflanzen wurden als (\*) für  $p < 0,05$  bezeichnet.

#### 4.10.2 Zuckerbestimmung in Mikroknollen

Die auf 10MS gebildeten Mikroknollen der Linien *StSUT4-RNAi*<sub>38</sub> und *StSUT4-RNAi*<sub>63</sub> wurden für die quantitative Bestimmung von löslichen Zuckern (Glukose, Fruktose und Saccharose) und Stärke verwendet. Insgesamt zeigten die Knollen von beiden untersuchten transgenen Linien einen erhöhten Zuckergehalt im Vergleich zu Wildtypknollen. Die Knollen der Linie *StSUT4-RNAi*<sub>63</sub> zeigten eine signifikante Erhöhung des Gehalts aller untersuchten Zucker mit Ausnahme von Fruktose. Die *StSUT4-RNAi*<sub>38</sub> Knollen zeigten einen erhöhten Stärkegehalt (Abb 18).

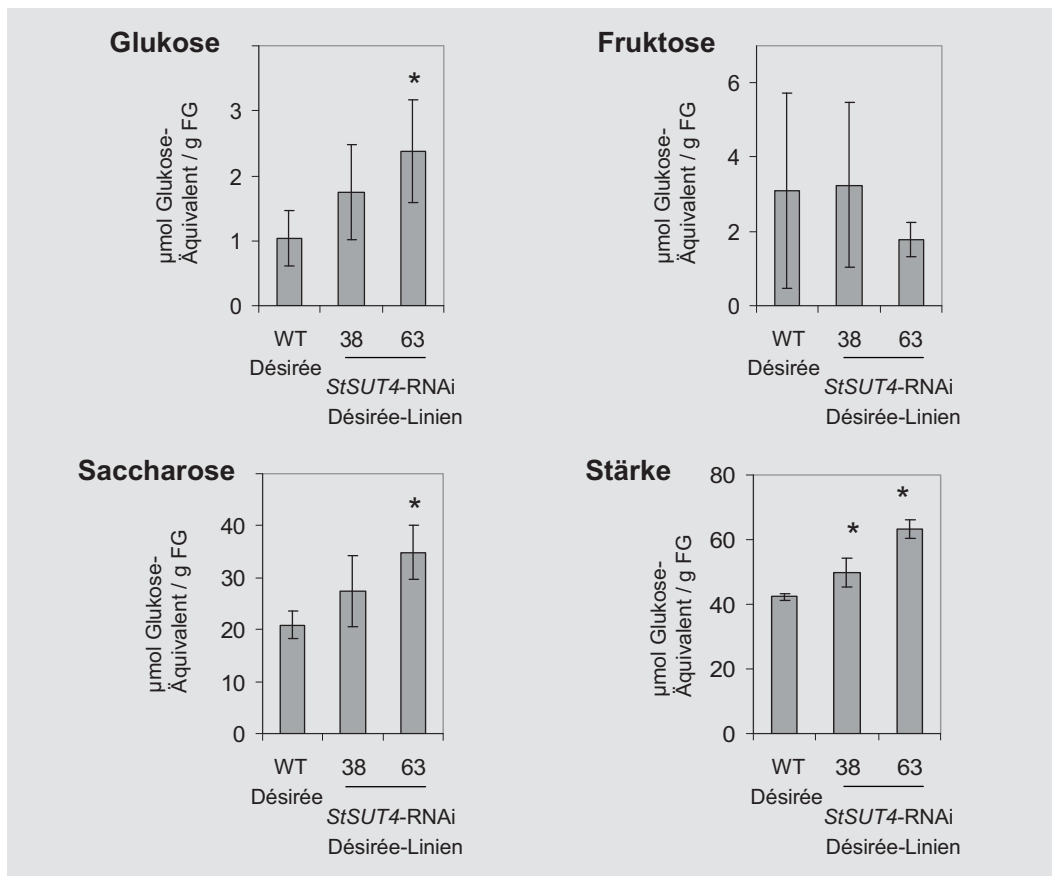


Abb. 18: Enzymatische Zuckerbestimmung in *in vitro* Knollen von *StSUT4*-RNAi und Désirée Wildtyp-Pflanzen, die auf Medium mit 10% Sacharosekonzentration induziert wurden. Es wurden gemittelte Werte  $\pm$  SD ( $n > 3$ ) von einem repräsentativen Experiment dargestellt. Die Ergebnisse wurden in 2 unabhängigen Experimenten bestätigt. Die signifikanten Unterschiede zwischen transgenen und Wildtyp Pflanzen wurden als (\*) für  $p < 0,05$  bezeichnet. Eine unterschiedliche Skalierung wurde angewendet.

#### 4.11 Analyse von *StSUT4*-RNAi-Tomaten

Parallel zu den Analysen der *StSUT4*-RNAi Kartoffelpflanzen wurde der Phänotyp von 7 ausgewählten transgenen *StSUT4*-RNAi Tomatenlinien beschrieben (Kap. 4.2; Abb. 4B). Während der vegetativen Wachstumsphase zeigten die transgenen Pflanzen im Vergleich zu den WT-Tomaten keine signifikanten Unterschiede. Im Vergleich zum WT wurden bei den *StSUT4*-RNAi Tomaten auch keine signifikanten Veränderungen im Blühverhalten beobachtet (nicht gezeigt).



Abb. 19: Frühzeitiges Reifen der Früchte von *StSUT4*-RNAi Linie 11 im Vergleich zum Wildtyp (oben links) und die qualitativen Unterschiede zwischen den WT Früchten (unten links) und den Früchten von zwei ausgewählten *StSUT4*-RNAi Linien (rechts oben und unten).

Analyse der Früchte und vor allem Auswertung des Ertrags von *StSUT4*-RNAi Tomaten zeigten dagegen quantitative und qualitative Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 19). Bei *StSUT4*-RNAi Tomaten wurde eine Tendenz zur früheren Fruchtreife beobachtet, und die roten Früchte der transgenen Tomate schienen oft kleiner als die reifen WT Früchte zu sein (Abb. 19). Um dieses Phänomen statistisch auszuwerten, wurden die Früchte von den 3 untersten Rispen, kurz bevor die Tomatenpflanzen die fünfte obere Rispe ausgebildet haben, geerntet und analysiert.

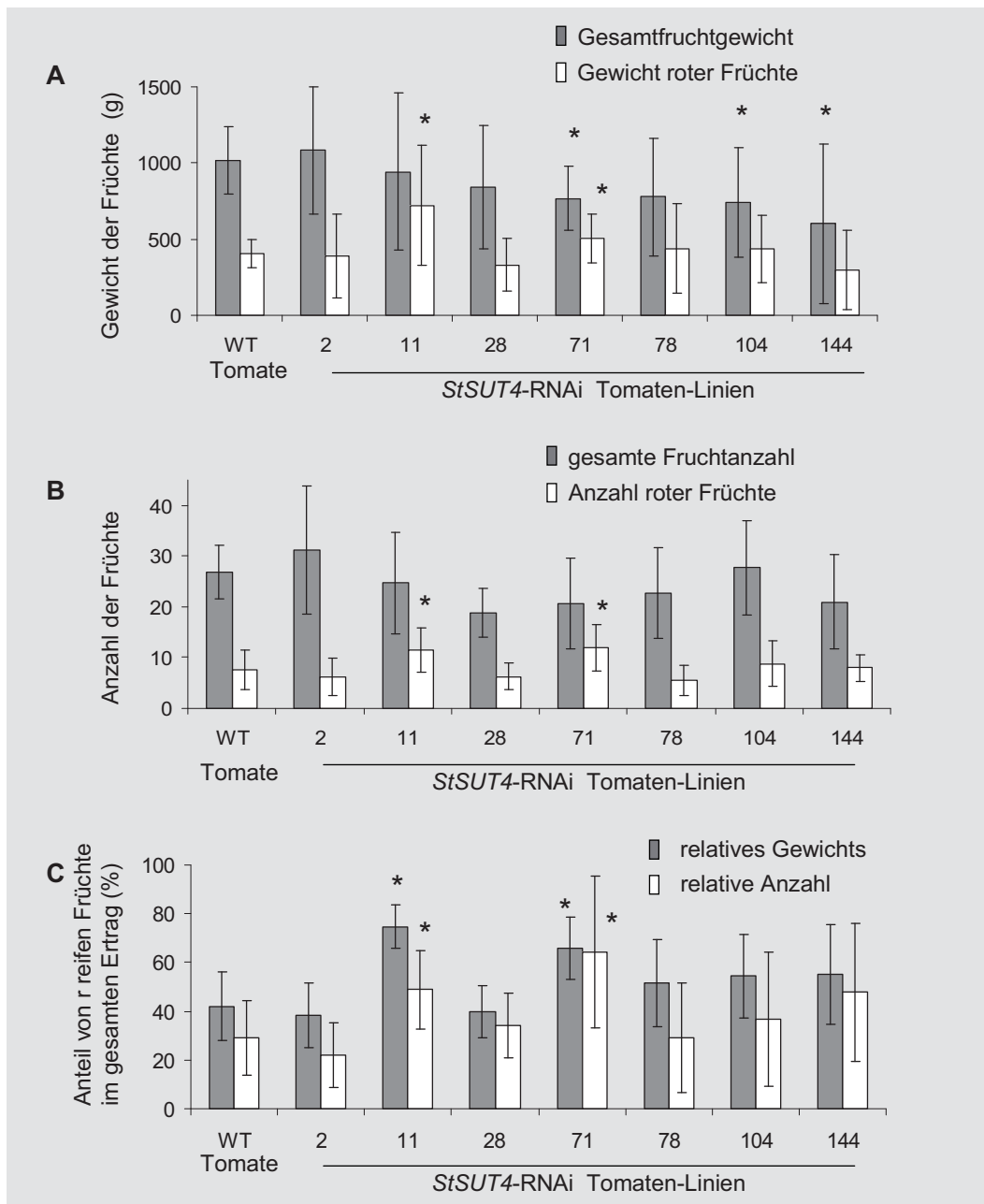


Abb. 20: Analyse des Fruchtertrags von *StSUT4*-RNAi und Wildtyp Tomaten A. Gesamter Fruchtertrag und das Gewicht von roten Früchten pro Pflanze B. Gesamte Fruchtanzahl und die Anzahl roter Früchte pro Pflanze C. Prozentualer Anteil von reifen Früchten am gesamten Ertrag (entsprechend als relatives Gewicht und relative Anzahl bezeichnet). Es wurden gemittelte Werte  $\pm$  SD ( $n > 5$ ) von einem repräsentativen Experiment dargestellt. Die Ergebnisse wurden in zwei unabhängigen Experimenten bestätigt. Die signifikanten Unterschiede zwischen transgenen und Wildtyp Pflanzen wurden als (\*) für  $p < 0,05$  bezeichnet. Eine unterschiedliche Skalierung wurde angewendet.

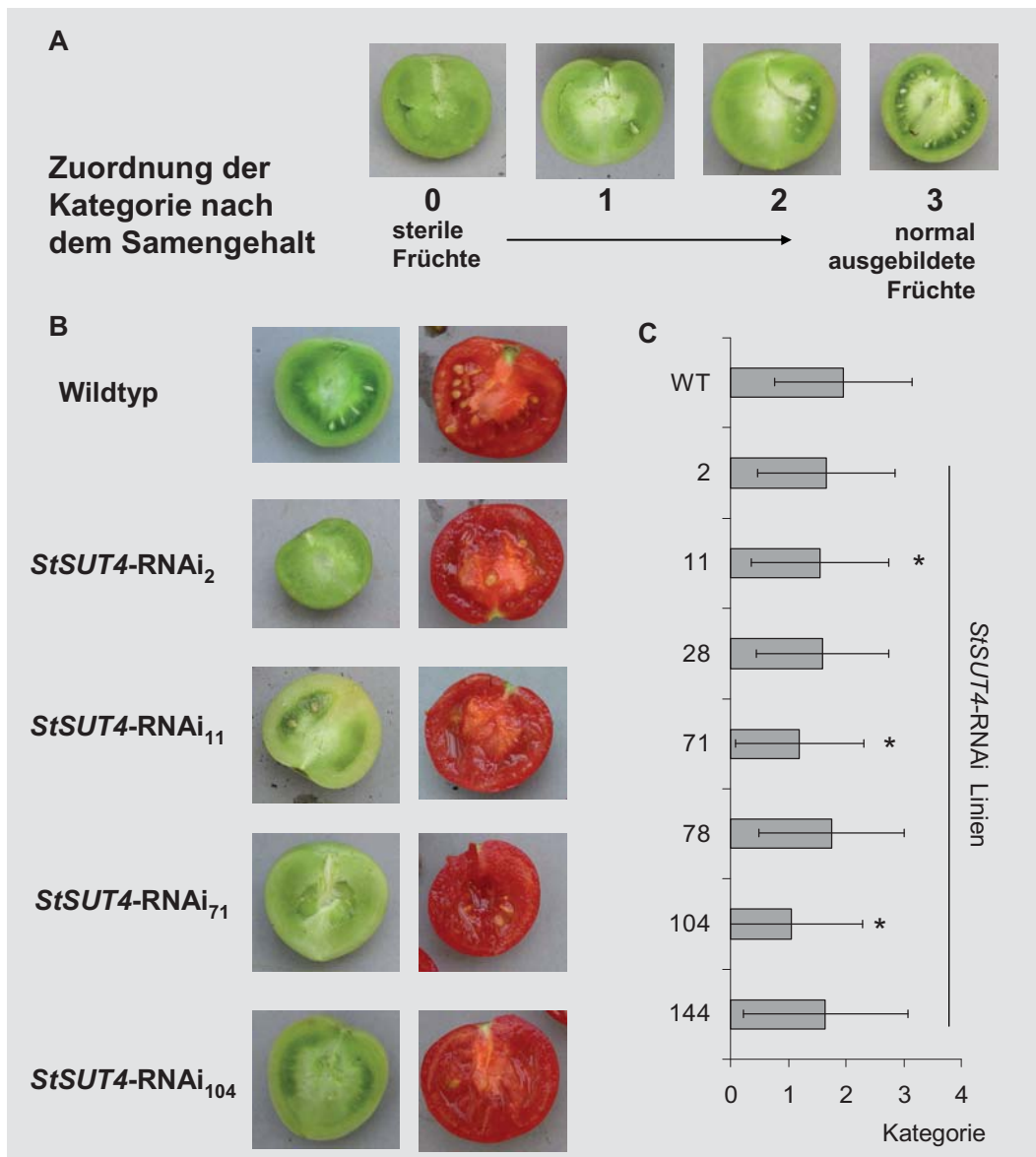


Abb. 21: Analyse des Samengehalts in den *StSUT4*-RNAi und Wildtyp Tomatenfrüchten A. für die statistische Auswertung wurden die Früchte der Länge nach geschnitten und je nach Samengehalt einer von vier Kategorien (von 0 bis 3) zugeordnet B. Frucht-Längsschnitte von ausgewählten transgenen und WT Tomaten stellen die unterschiedliche Samenanzahl dar C. Darstellung des durchschnittlichen Samengehalts nach der statistischen Auswertung der Samengehaltskategorie. Gemittelte Werte  $\pm$  SD eines repräsentativen Experiments ( $n=20$ ) sind dargestellt. Die Ergebnisse wurden in zwei unabhängigen Experimenten bestätigt. Die signifikanten Unterschiede zwischen transgenen und Wildtyp Pflanzen wurden als (\*) für  $p<0,05$  bezeichnet.

Das Gesamtfruchtgewicht pro Pflanze zeigte sich bei den transgenen Tomatenlinien: *StSUT4-RNAi*<sub>71</sub>, *StSUT4-RNAi*<sub>104</sub> und *StSUT4-RNAi*<sub>144</sub>; signifikant niedriger als beim Wildtyp (Abb 20 A). Für zwei transgene Linien, *StSUT4-RNAi*<sub>11</sub> und *StSUT4-RNAi*<sub>71</sub>, wurde dagegen ein signifikant höheres Gewicht roter Früchte pro Pflanze nachgewiesen (Abb 20 A). Keine signi-



signifikante Unterschiede zwischen der gesamten Anzahl von Früchten beim WT und bei *StSUT4*-RNAi Tomatenlinien wurde gezeigt. Aber die absolute Anzahl von reifen Früchten pro Pflanze war bei den Linien *StSUT4*-RNAi<sub>11</sub> und *StSUT4*-RNAi<sub>71</sub> signifikant höher als beim WT (Abb 20 B). Auch der prozentuale Anteil des Gewichts und der Anzahl (relatives Gewicht und relative Anzahl) von roten Früchten, die entsprechend auf den Gesamtertrag und die gesamte Fruchtanzahl pro Pflanze bezogen wurden, waren bei den Linien *StSUT4*-RNAi<sub>11</sub> sowie auch *StSUT4*-RNAi<sub>71</sub> signifikant erhöht (Abb 20 C).

Untersuchung der Unterschiede in der Größe von reifen WT und *StSUT4*-RNAi Früchten wurde indirekt durchgeführt. Da die Größe der Tomatenfrüchte positiv mit der Anzahl der Samen korreliert (berichtet in Hackel *et al.*, 2006), wurde eine statistische Analyse des Samengehalts in den Früchten durchgeführt. Jede analysierte Frucht von jeder Pflanze wurde durch eine Zahl von 0 bis 3 beschrieben. Die Zahlen von 0 bis 3 sollten den unterschiedlichen Samengehalt der einzelnen Früchte bezeichnen (Abb. 21 A). In jeder analysierten Tomatenlinie wurden Früchte von allen 4 (0 bis 3) beschriebenen Kategorien gefunden. Die jeweilige Anzahl der zu den 4 Kategorien gehörenden Früchte unterschieden sich jedoch bei den untersuchten Linien. Die transgenen Tomaten stellten öfter Früchte mit wenigen oder gar keinen Samen her (Abb. 21 B). Im Fall der transgenen Linien, *StSUT4*-RNAi<sub>11</sub>, *StSUT4*-RNAi<sub>71</sub> und *StSUT4*-RNAi<sub>104</sub>, wurde der signifikant reduzierte Samengehalt nachgewiesen (Abb. 21 C).

## **4.12 Untersuchungen des Zusammenspiels des *SUT4* mit Gibberellinen**

### **4.12.1 GA Komplementationsversuch**

Viele der phänotypischen Veränderungen, die in den Kartoffeln nach der *SUT4*-Inhibition eintraten, z. B. die verkürzten Internodien, erhöhter Knollenertrag könnten auf Veränderungen des endogenen Gibberellin-Gehalts oder Störungen im Gibberellin-Signaltransduktionsvorgang hinweisen. Junge Kartoffelpflanzen von vier *StSUT4*-RNAi Linien und Wildtyp wurden einer Gibberellinsäure(GA<sub>3</sub>)-Behandlung unterzogen. Durch GA<sub>3</sub>-

Behandlung der *StSUT4*-RNAi Kartoffelpflanzen wurde der Versuch unternommen, den Wildtyp-Phänotyp wiederherzustellen. Parallel wurde eine Kontrollgruppe mit Wasser behandelt. Die mit Wasser besprühte Kontrollgruppe der Kartoffelpflanzen benahm wie die früher beschriebenen unbehandelten Pflanzen (Kap. 4.5).

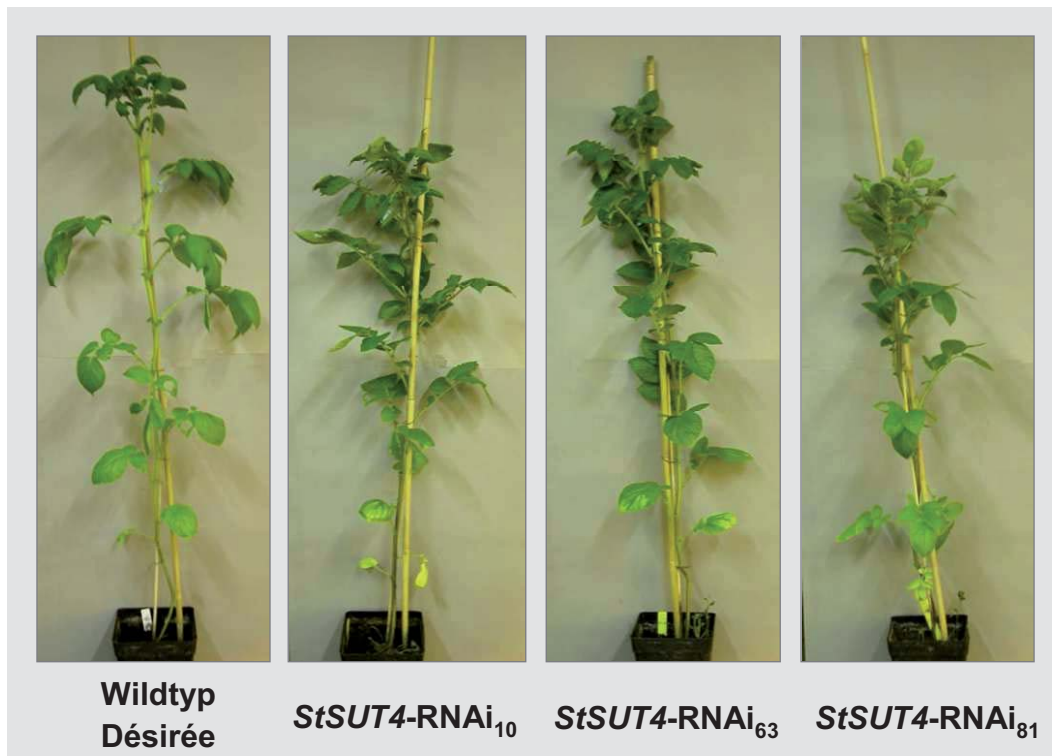


Abb. 22: Phänotyp von *StSUT4*-RNAi und Wildtyp-Désirée nach GA<sub>3</sub>-Behandlung unter LT-Bedingungen

Der Versuch der Wiederherstellung des Wildtyp-Phänotyps in den *StSUT4*-RNAi Kartoffelpflanzen durch die GA<sub>3</sub>-Applikation ist nicht gelungen. Die phänotypischen Unterschiede zwischen den transgenen Pflanzen und dem WT sind nach der GA-Applikation sogar noch deutlicher als im Fall der unbehandelten bzw. mit Wasser behandelten Pflanzen. Die mit GA<sub>3</sub> behandelte Gruppe zeigte ein gesteigertes Internodienwachstum (Abb. 22). Die transgenen Pflanzen blieben jedoch trotz der GA<sub>3</sub>-Behandlung kleiner als WT und das Internodienwachstum war bei den transgenen Linien schwächer als im WT (Abb. 23 A). Statistische Auswertung der Längen des Stängelsegments der 5 oberen Internodien zeigte, dass das durch GA<sub>3</sub>-Applikation induzierte Internodienwachstum von 2 transgenen Linien *StSUT4*-RNAi<sub>10</sub>

und *StSUT4*-RNAi<sub>81</sub> signifikant kleiner war als im Fall der entsprechenden WT-Kontrolle (Abb. 23 B).

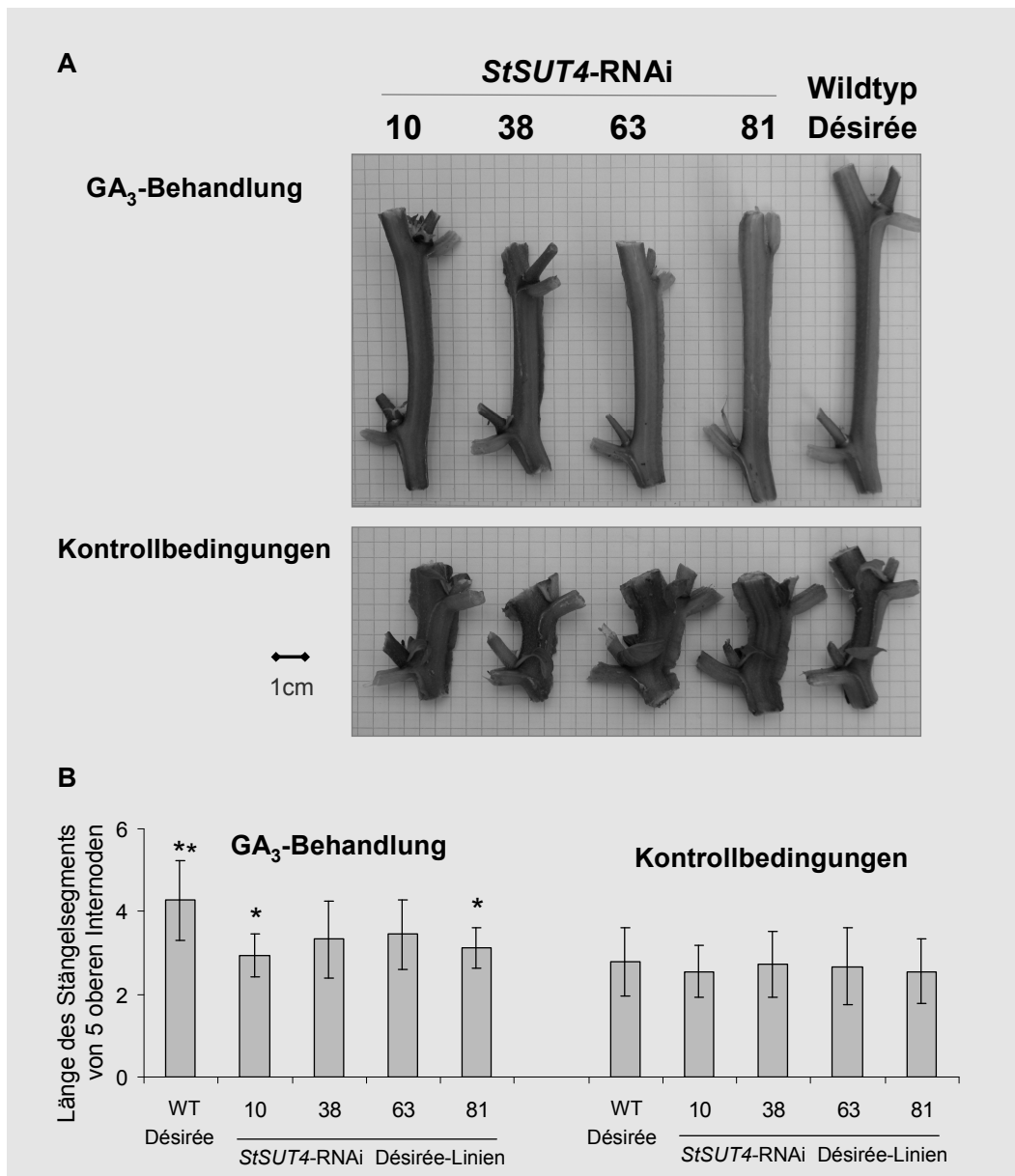


Abb. 23: Auswertung des Internodienwachstums von *StSUT4*-RNAi und Wildtyp-Désirée nach GA<sub>3</sub>-Behandlung unter LT-Bedingungen. A. Vergleich der siebten Internodien nach und ohne GA-Behandlung B. Analyse der Länge des Stängelsegments der 5 oberen Internodien. Es wurden die Werte  $\pm$  SD (n=3) von einem repräsentativen Experiment dargestellt. Die Ergebnisse wurden in 2 unabhängigen Experimenten bestätigt. Die signifikanten Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen transgenen und Wildtyp Pflanzen wurden als (\*) und zwischen denselben Linien nach unterschiedlichen Behandlung als (\*\*) bezeichnet.

Außerdem war das Internodienwachstum beim WT nach der GA<sub>3</sub>-Applikation im Vergleich zum Wasser-behandelten Wildtyp signifikant erhöht, während keine signifikanten Unterschiede zwischen der Internodienlänge von allen 4 *StSUT4*-RNAi Linien und Wasser-behandelten transgenen Linien gezeigt werden konnten. Weitere Analysen betrafen den Einfluss von Gibberellinsäure auf das Blühverhalten von *StSUT4*-RNAi und Wildtyp Kartoffelpflanzen. Der Blühzeitpunkt der GA<sub>3</sub>-behandelten *StSUT4*-RNAi Kartoffelpflanzen war im Vergleich zu den unbehandelten (Kap. 4.5.2) bzw. mit Wasser behandelten transgenen Pflanzen unverändert (Abb. 24). Die Wildtyp Pflanzen erblühen nach GA<sub>3</sub>-Behandlung dagegen signifikant später als WT ohne GA-Behandlung.

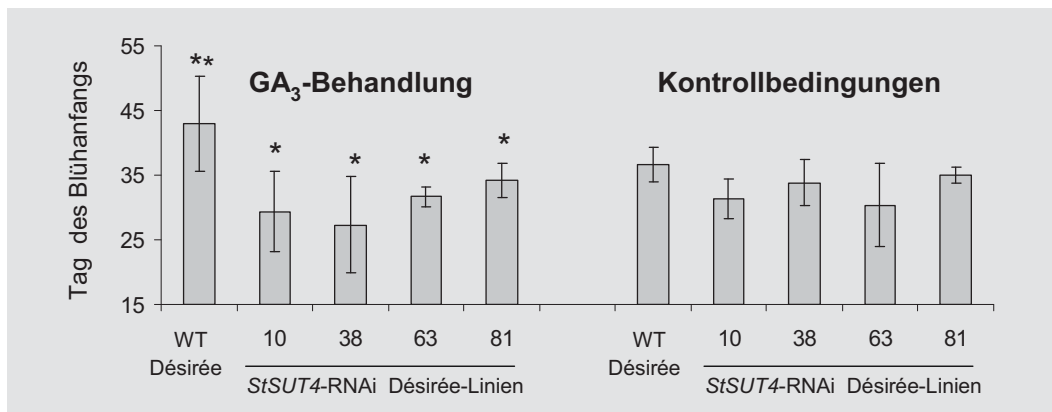


Abb. 24: Tag des Blühanfangs von *StSUT4*-RNAi Linien und Wildtyp-Désirée nach GA<sub>3</sub>-Behandlung unter LT-Bedingungen im Vergleich zu Wasser-behandelter Pflanzengruppe. Es wurden die Werte  $\pm$  SD (n=3) von einem repräsentativen Experiment dargestellt. Die Ergebnisse wurden in zwei unabhängigen Experimenten bestätigt. Die signifikanten Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen transgenen und Wildtyp Pflanzen wurden als (\*) und zwischen denselben Linien nach unterschiedlichen Behandlung als (\*\*) bezeichnet.

Die Auswertung des Knollenertrags wurde zwei Monate nach der GA<sub>3</sub>-Behandlung durchgeführt. Signifikante Unterschiede wurden nicht nur im gesamten Knollengewicht sondern auch im äußeren Schein und in der Knollenanzahl pro Pflanze zwischen *StSUT4*-RNAi Kartoffelpflanzen und dem Wildtyp festgestellt (Abb. 25).

GA<sub>3</sub>-Applikation verursachte bei den *StSUT4*-RNAi Kartoffeln die Herstellung von Knollen mit einem merkbar veränderten Phänotyp. *StSUT4*-RNAi Knollen von GA<sub>3</sub>-behandelten

Pflanzen stellten eine langgestreckte Form und eine wesentlich hellere, ungleichmäßige Färbung dar, während die WT-Knollen nach GA<sub>3</sub>-Behandlung im Vergleich zu den Knollen von unbehandelten Pflanzen nicht so drastisch verändert waren (Abb. 25 A).

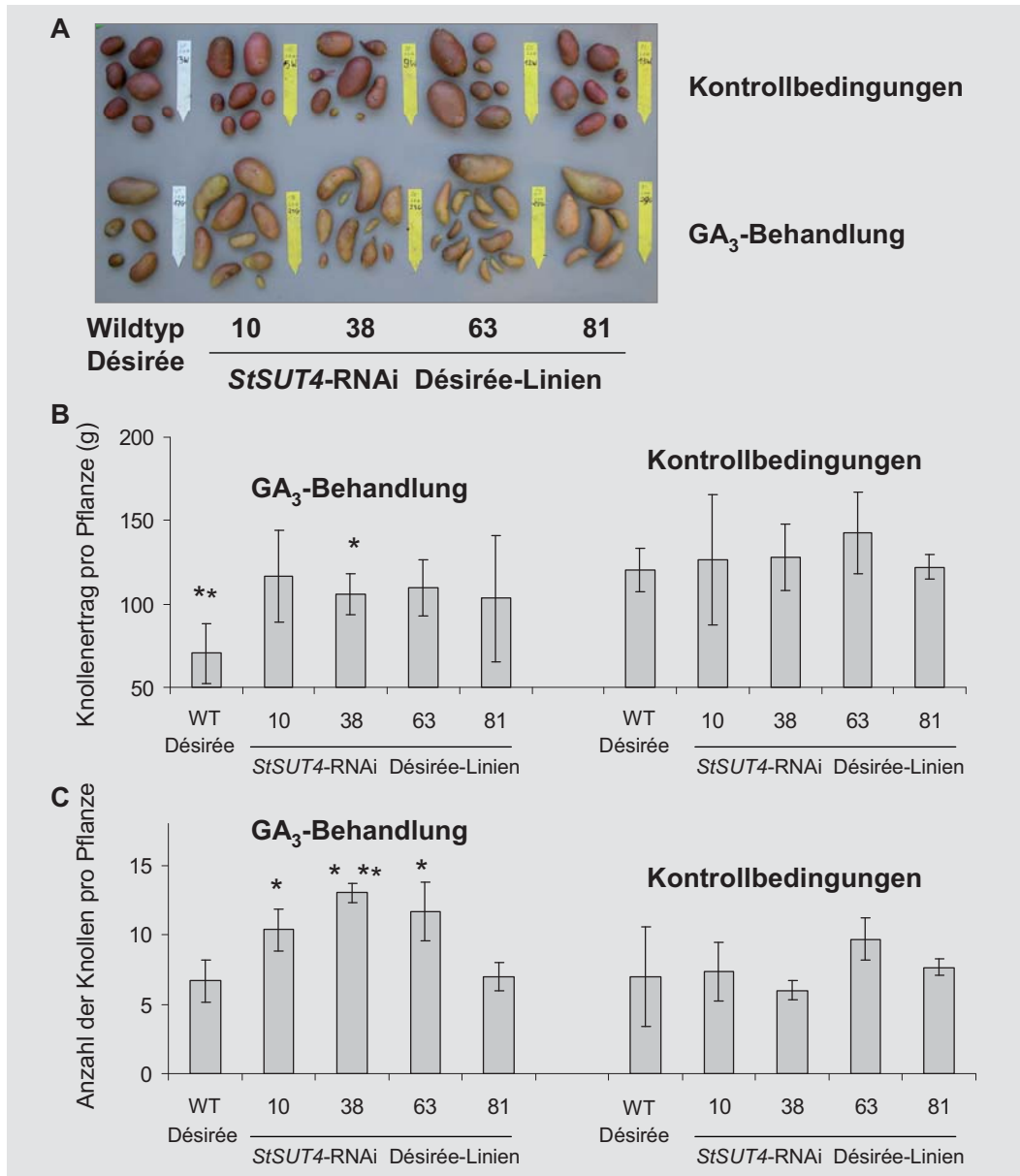


Abb. 25: Knollenertragsanalyse von *StSUT4*-RNAi und Wildtyp-Désirée-Pflanzen nach GA<sub>3</sub>-Behandlung im Vergleich zu unbehandelten Kontrollpflanzen. Das Experiment wurde unter LT-Bedingungen durchgeführt. A. Knollenmorphologie B. gesamtes Knollengewicht pro Pflanze C. Knollenanzahl pro Pflanze. Es wurden die Werte  $\pm$  SD (n=3) von einem repräsentativen Experiment dargestellt. Die Ergebnisse wurden in 2 unabhängigen Experimenten bestätigt. Die signifikanten Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen transgenen und WT Pflanzen wurden als (\*) und zwischen denselben unterschiedlich behandelten Linien als (\*\*) bezeichnet.

Während die Behandlung mit Gibberellinsäure-Lösung bei den WT Pflanzen eine signifikante Abnahme des gesamten Knollengewichts (über 50%) pro Pflanze verursachte, konnten im Fall der mit GA<sub>3</sub>-behandelten *StSUT4*-RNAi Pflanzen keine derartigen Veränderungen des gesamten Knollengewichts festgestellt werden (Abb. 25 B). Das Knollengewicht von GA<sub>3</sub>-behandelten transgenen Pflanzen ist höher als das Knollengewicht von GA<sub>3</sub>-behandelten WT-Pflanzen, jedoch nur im Fall von Linie *StSUT4*-RNAi<sub>38</sub> wurde diese Erhöhung signifikant

Weitere nach GA<sub>3</sub>-Applikation zu beobachtende Veränderungen betrafen die Knollenanzahl pro Pflanze. Die Steigerung von der durchschnittlichen Knollenanzahl pro Pflanze infolge der GA<sub>3</sub>-Behandlung wurde bei *StSUT4*-RNAi Linien im Vergleich zu denselben transgenen Linien aus der Kontrollgruppe beobachtet. Im Fall der Linie *StSUT4*-RNAi<sub>38</sub> war diese Steigerung signifikant. Keine signifikanten Unterschiede in der Knollenanzahl wurden unter den Pflanzen aus der mit Wasser behandelten Gruppe festgestellt, was mit vorhergehenden Beobachtungen übereinstimmt (Kap. 4.5.3).

#### **4.12.2 Gibberellinsäure-Applikation *in vitro***

Eine hohe Saccharosekonzentration im Knolleninduktionssmedium (Kap. 4.10.1) verursachte nicht nur die erfolgreiche Induktion der Knöllchenbildung bei transgenen *StSUT4*-RNAi sowie WT Kartoffeln sondern auch eine stärkere Inhibition des Seitentriebwachstums. Interessanterweise war die Ausbildung von Seitentrieben auf 10MS beim WT stärker reduziert als bei den *StSUT4*-RNAi-Linien (Abb. 26). Die Abhängigkeit des Wachstums der *in vitro* kultivierten WT- und *StSUT4*-RNAi-Sprossen von der Saccharosekonzentration und von exogener GA<sub>3</sub>-Konzentration wurde miteinander verglichen. Es wurde Medium mit jeweils 2 (2MS) bzw. 10 (10MS) % w/v Saccharosekonzentration verwendet. Die im Dunkel auf 2MS ohne GA<sub>3</sub> gewachsenen WT-Seitentriebe waren signifikant länger als *StSUT4*-RNAi-Seitentriebe. Dieser Unterschied wurde durch Zugabe von 0,6 µM GA<sub>3</sub> noch verstärkt. Auf 10MS-Medium war das Wachstum von WT Sprossen stark reduziert und *StSUT4*-RNAi Pflanzen dagegen zeigten keinen Unterschied im Vergleich zur Anzucht auf 2MS. Das WT-Seitentriebwachstum wurde durch GA<sub>3</sub>-Zugabe verstärkt (auf 2MS stärker als auf 10MS). Wachstum von *StSUT4*-RNAi Sprossen nach GA<sub>3</sub>-Zugabe war auf 2 MS und 10 MS ver-

gleichbar. Bei Wachstum auf 10MS konnte in Anwesenheit von GA<sub>3</sub> kein Unterschied mehr zwischen der Sprosslänge von *StSUT4*-RNAi und WT-Pflanzen beobachtet werden.

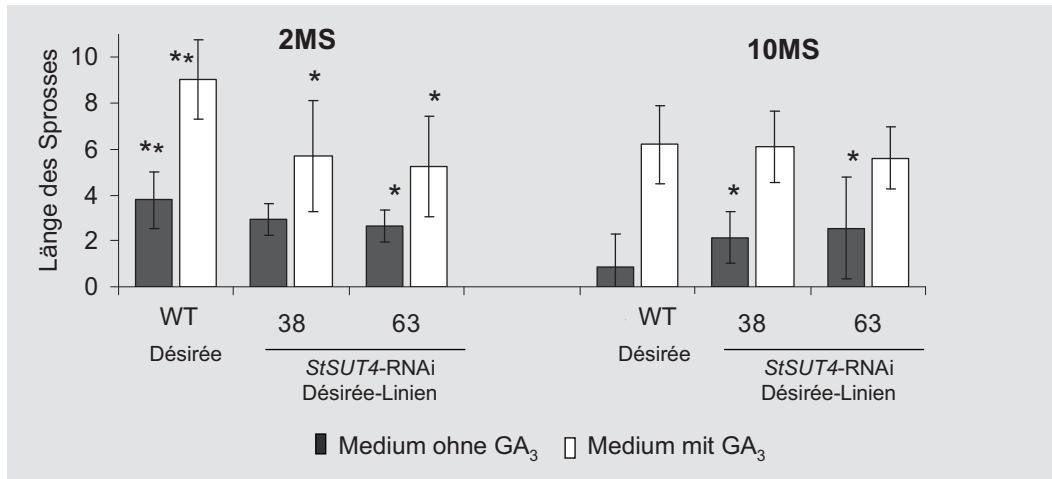


Abb. 26: Seitentriebwachstum von *in vitro* kultivierten *StSUT4*-RNAi und Désirée Wildtyp-Stecklingen im Dunkeln abhängig von GA<sub>3</sub> und Saccharosekonzentration. Mittelwerte ± SE für 30-50 Stecklingen sind dargestellt. Die signifikanten Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen transgenen und WT Pflanzen unter gleichen Anzuchtbedingungen wurden als (\*) und zwischen denselben Linien unter unterschiedlichen Anzuchtbedingungen als (\*\*) bezeichnet.

#### 4.12.3 Bestimmung von *StGA20ox1* Expression

Die GA20 Oxidase spielt eine Schlüsselrolle in der Biosynthese von aktiver Gibberellin. Die Untersuchungen des relativen Transkriptgehaltes des Gens für eine Kartoffel-GA20 Oxidase, *StGA20ox1*, das vor allem in *Source*-Blättern exprimiert ist (Carrera *et al.*, 2000), sollten klären, ob die inhibierte *SUT4* Expression den GA-Metabolismus beeinflussen kann.

Die im LT mittels *real time* PCR durchgeführten Analysen zeigten diurnale Veränderungen in der *StGA20ox1* Transkriptakkumulation (Abb 27). Während der Lichtperiode stellten beide untersuchten transgene Linien, *StSUT4*-RNAi<sub>10</sub> und *StSUT4*-RNAi<sub>81</sub>, eine geringere Akkumulation der *StGA20ox1*-Transkripte im Vergleich zum WT dar. Diese Unterschiede waren meistens auch statistisch signifikant. Das Maximum der *StGA20ox1*-Transkriptakkumulation

wurde am Ende und das Minimum (über 6fach im Vergleich zum Maximum) am Anfang der Dunkelperiode festgestellt.

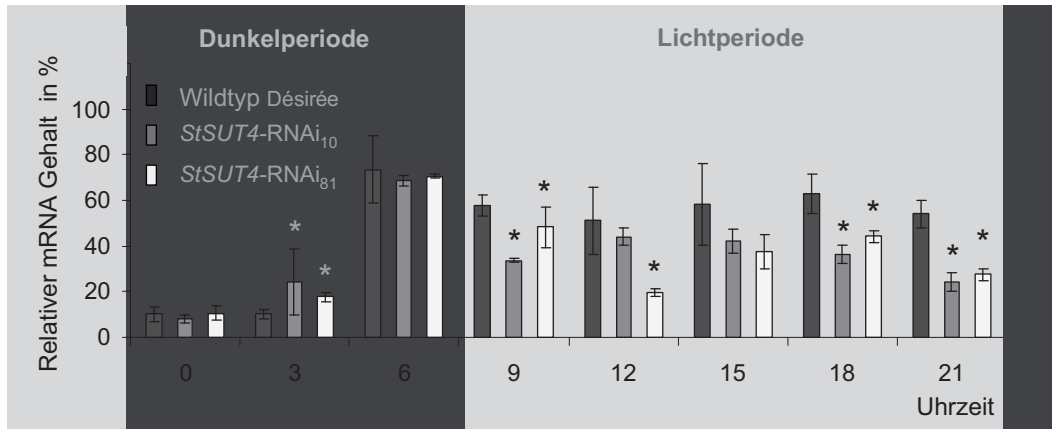


Abb. 27: Akkumulation der *StGA20ox1*-Transkripte in *StSUT4*-RNAi und WT Désirée nach GA<sub>3</sub>-Behandlung im LT. Es wurden die Werte ± SD (n=3) von einem repräsentativen Experiment dargestellt. Die Ergebnisse wurden in zwei unabhängigen Experimenten bestätigt. Die signifikanten Unterschiede zwischen transgenen und Wildtyp Pflanzen wurden als (\*) für p<0,05 bezeichnet.

## 4.13 Untersuchungen der Schattenvermeidungsreaktion

Die Beschattung bewirkt morphologische Veränderungen der Pflanzen, die sog. Schattenvermeidungsreaktion (*shade avoidance*). Die aufgetretene Schattenvermeidungsreaktion schien bei den *StSUT4*-RNAi Kartoffeln schwächer ausgeprägt als beim Wildtyp. Um dieses Phänomen näher zu untersuchen, wurden die Experimente unter künstlich hergestellten Beschattungsbedingungen durchgeführt.

### 4.13.1 Analyse der Pflanzen unter gegenseitigen Beschattung

Im ersten Experiment wurde der Effekt der gegenseitigen Beschattung der eng nebeneinander wachsenden Pflanzen angewendet, um die Schattenvermeidungsreaktion von 4 *StSUT4*-RNAi



Linien (10, 38, 63 und 81) und vom Désirée-Wildtyp zu analysieren. Junge Pflanzen von untersuchten Linien wurden dicht nebeneinander gestellt und die während des Wachstums entstehenden Phänotypveränderungen wurden beschrieben. Parallel dazu wurden die Pflanzen von denselben Linien weit nebeneinander als eine Kontrollgruppe (unbeschattete Pflanzen) angezogen.

Zwei Parameter: PPFD und HR:DR-Verhältnis, die freundlicherweise von Yvonne Pörs gemessen wurden, sollten die Lichtbedingungen unter den experimentellen Pflanzen genauer zu definieren. Die Lichtbedingungen der dicht stehenden, sowie der weit auseinander stehenden Pflanzen wurden auf der Ebene der oberen und unteren Blätter untersucht (Abb. 28 A). Die Lichtbedingungen, unter denen sich die oberen Teile von sowohl dicht, als auch weit auseinander stehenden Pflanzen befanden, waren vergleichbar, wie man an den Werten der gemessenen Lichtparameter erkennen kann. Die PPFD-Werte sowie auch die HR:DR-Verhältnisse waren dagegen im Fall der unteren Teile der dicht- und weit auseinander stehenden Pflanzen sehr unterschiedlich. Auf der Ebene der untersten Blättern von dicht stehenden Pflanzen wurde eine drastische Abnahme der Werte von beiden Parametern (PPFD ~40fach und HR:DR ~6fach) im Vergleich zu den obersten Pflanzenteilen beobachtet. Die Abnahme der beiden Parameterwerte im Fall von weit auseinander stehenden Pflanzen war wesentlich schwächer (PPFD ~3fach und HR:DR ~1,4fach).

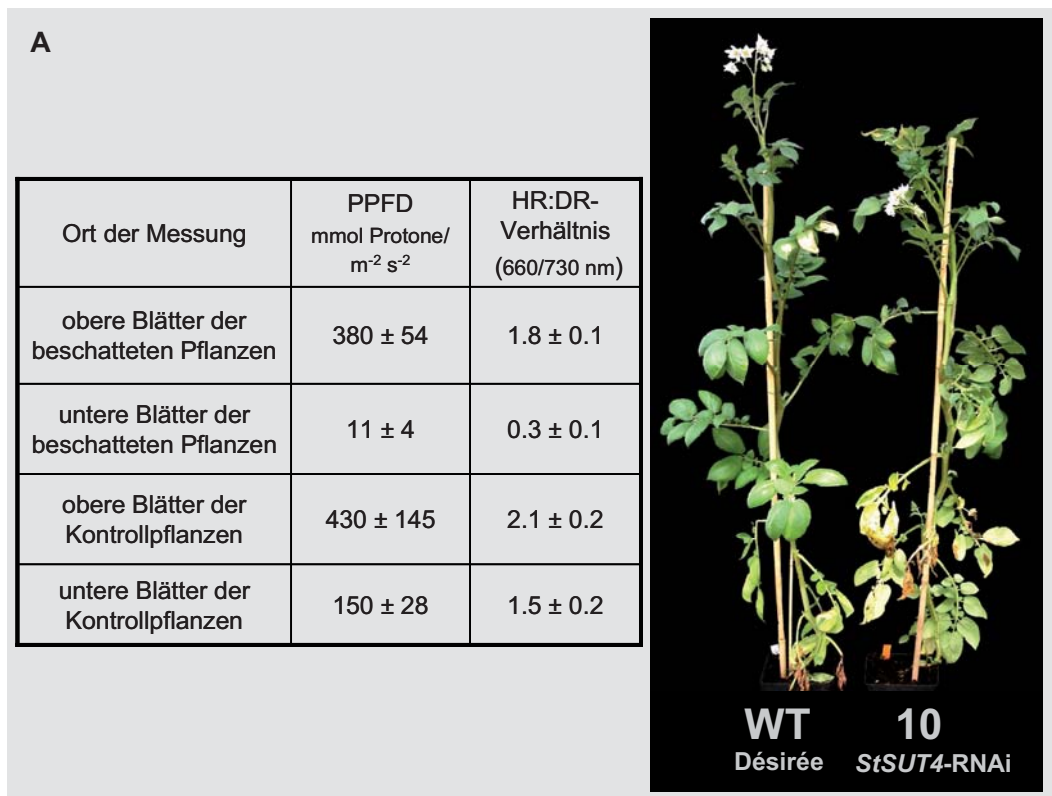


Abb. 28: Untersuchungen der Schattenmeidungsreaktion von *StSUT4*-RNAi und Wildtyp-Désirée Pflanzen.  
 A. Zusammenstellung der Werte von Parametern, die die Lichtbedingungen unten den dicht von einander und weit von einander stehenden Pflanzen beschrieben B. Phänotyp von *StSUT4*-RNAi und Wildtyp-Désirée nach 5 Wochen der dichten Anzucht (21 Pflanzen pro qm).

Nach 2 Wochen Anzucht unter hoher Pflanzendichte wurden bei den Pflanzen die ersten Symptome der Schattenvermeidungsreaktion beobachtet. Alle dicht gestellten Pflanzen wuchsen schneller als die vergleichbaren weit stehenden Kontrollpflanzen. Die nach weiteren Wochen des dichten Wachstums, infolge der Schattenvermeidungsreaktion entstehenden Phänotypveränderungen waren jedoch viel deutlicher beim WT als bei den transgenen Linien zu sehen (Abb. 28 B).

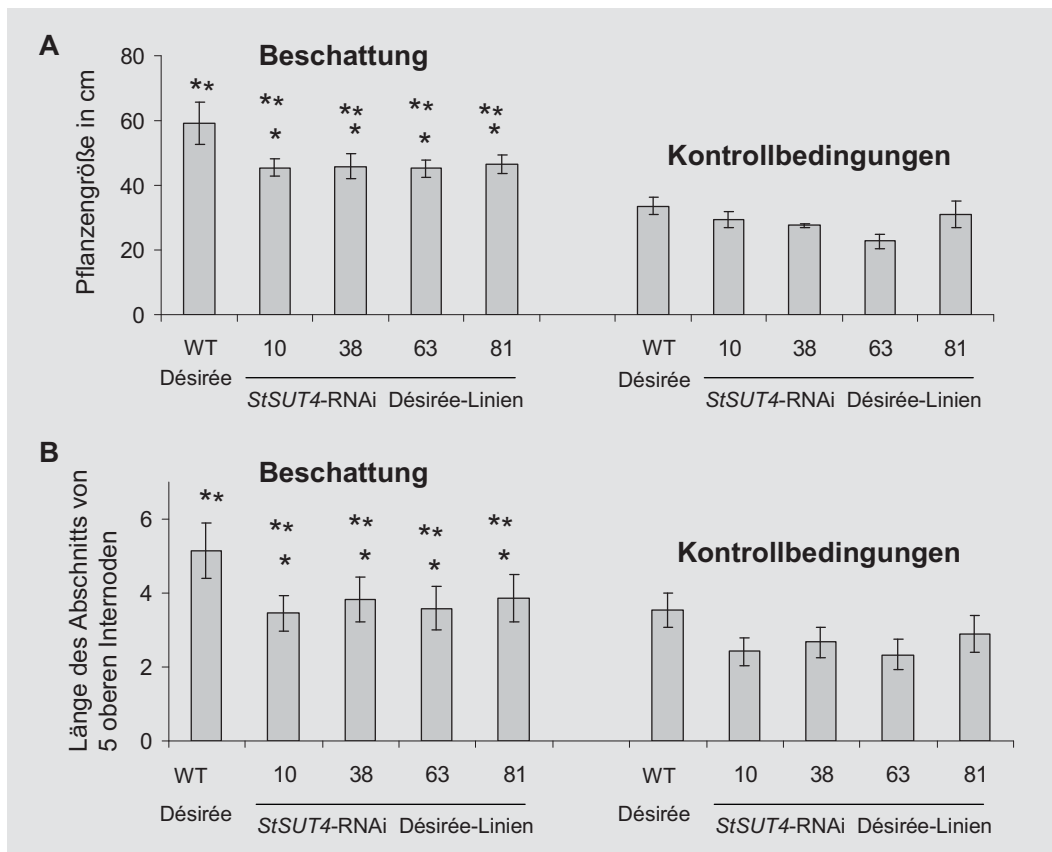


Abb. 29: Phänotypanalyse von beschatteten *StSUT4*-RNAi und Wildtyp-Désirée Pflanzen im Vergleich zu den unter normalen Lichtbedingungen wachsenden Pflanzen. Das Experiment wurde unter LT-Bedingungen durchgeführt A. Pflanzengröße B. Länge des Stängelsegments der 5 oberen Internodien. Es wurden die Werte  $\pm$  SD ( $n > 3$ ) von einem repräsentativen Experiment dargestellt. Die Ergebnisse wurden in 2 unabhängigen Experimenten bestätigt. Die signifikanten Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen transgenen und WT Pflanzen wurden als (\*) und zwischen denselben Linien unter unterschiedlichen Lichtbedingungen als (\*\*) bezeichnet.

Kurz bevor die Pflanzen die generative Entwicklungsphase erreicht hatten, wurde die Pflanzengröße und das Internodienwachstum analysiert. Alle dicht stehenden *StSUT4*-RNAi und WT Pflanzen waren signifikant größer (Abb. 29 A) und zeigten ein signifikant induziertes Internodienwachstum im Vergleich zu den weit auseinander gestellten Kontrollpflanzen (Abb. 29 B). Die Pflanzengröße, sowie auch die Länge des Stängelsegments der 5 oberen Internodien der beschatteten WT-Pflanzen waren am höchsten. Bei den beschatteten *StSUT4*-RNAi Pflanzen waren diese Wachstumsparameter signifikant niedriger als beim beschatteten WT.

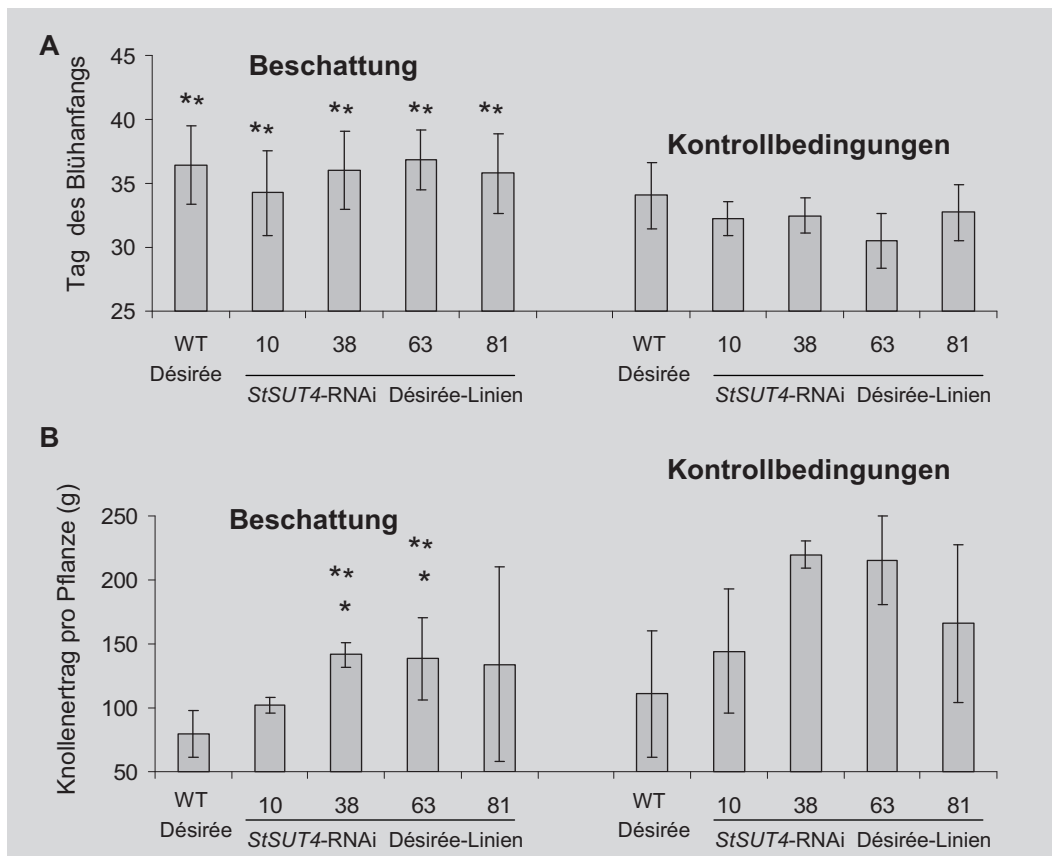


Abb. 30: Phänotypanalyse von beschatteten *StSUT4*-RNAi und Wildtyp-Désirée Pflanzen im Vergleich zu den unter normalen Lichtbedingungen wachsenden Pflanzen A. Blühverhalten B. Knollenertrag. Das Experiment wurde unter LT-Bedingungen durchgeführt. Es wurden die Werte  $\pm$  SE ( $n > 4$ ) von einem repräsentativen Experiment dargestellt. Die Ergebnisse wurden in 2 unabhängigen Experimenten bestätigt. Die signifikanten Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen transgenen und WT Pflanzen wurden als (\*) und zwischen denselben Linien unter unterschiedlichen Lichtbedingungen als (\*\*) bezeichnet.

Alle beschatteten Pflanzen haben signifikant später als die unbeschatteten Pflanzen geblüht. Im Schatten waren keine signifikanten Unterschiede mehr im Blühverhalten von *StSUT4*-RNAi und WT Pflanzen zu beobachten (Abb. 30 A). Die transgenen Pflanzen zeigten unter Kontrollbedingungen dagegen ein signifikant beschleunigtes Erblühen im Vergleich zum WT was mit den früher dargestellten Daten übereinstimmte (Kap. 4.5.2).

Die Ertragsanalysen haben die Reduktion des gesamten Knollengewichts von allen beschatteten transgenen und WT-Pflanzen im Vergleich zu unbeschatteten gezeigt, jedoch nur im Fall von 2 transgenen Linien *StSUT4*-RNAi<sub>38</sub> und *StSUT4*-RNAi<sub>63</sub> war diese Reduktion des Knol-

lenertrages signifikant (Abb. 30 B). Die Auswertung des gesamten Knollengewichts aller beschatteten Pflanzen hat keine Unterschiede mehr zwischen WT Pflanzen und 2 transgenen Linien: *StSUT4*-RNAi<sub>10</sub> und *StSUT4*-RNAi<sub>81</sub> gezeigt, die Linien *StSUT4*-RNAi<sub>38</sub> sowie *StSUT4*-RNAi<sub>63</sub> präsentierten dagegen einen signifikant höheren Knollenertrag im Vergleich zum beschatteten WT.

#### **4.13.2 Beschattungseinfluss auf die relative *StSUT4*-Expression**

*Source*-Blätter sind die Organe der Pflanze, die für die Lichtsignalaufnahme aus der Umwelt verantwortlich sind. Die relative *SUT4*-Expression in den *Source*-Blättern von beschatteten und unbeschatteten Pflanzen (*StSUT4*-RNAi und WT) wurde in der Mitte und am Ende der Lichtperiode geprüft. Die dicht stehenden Pflanzen zeigten eine höhere Akkumulation der *SUT4*-mRNA als die weit auseinander stehenden unbeschatteten Kontrollpflanzen (Abb. 31). In der Mitte des Tages war der Gehalt von *SUT4*-Transkripten in beschatteten Blättern von Linien *StSUT4*-RNAi<sub>10</sub> und *StSUT4*-RNAi<sub>81</sub> sowie auch in den WT-Blättern signifikant höher als bei den entsprechenden unbeschatteten Kontrolllinien. Am Ende des Tages dagegen war die *SUT4*-Akkumulation in Blättern von beschatteten höher als in unbeschatteten WT-Pflanzen, während keine signifikanten Unterschiede zwischen dicht- und weit auseinander stehenden transgenen Pflanzen festgestellt wurden. Zu den beiden untersuchten Zeitpunkten blieb das *SUT4*-Expressionsniveau in den transgenen *Source*-Blättern unter Beschattungsbedingungen signifikant niedriger als in den beschatteten WT-Blättern.

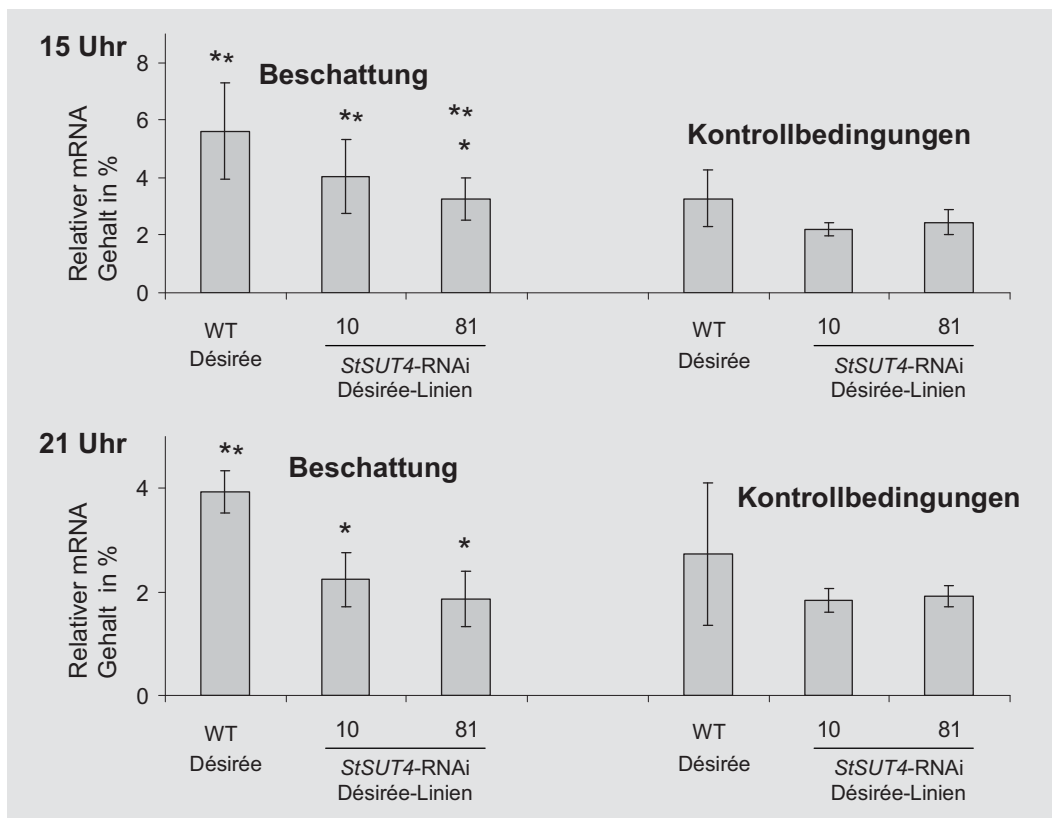


Abb. 31: Akkumulation der *SUT4*-Transkripte in *Source*-Blättern von *StSUT4*-RNAi und Wildtyp-Désirée beschatteten Pflanzen im Vergleich zu den *Source*-Blättern von den unter normalen Lichtbedingungen wachsenden Pflanzen. Mittelwerte  $\pm$  SD des relativen Transkriptgehalts in 3-5 Proben von mindestens 3 Pflanzen wurden dargestellt. Die signifikanten Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen transgenen und WT Pflanzen wurden als (\*) und zwischen denselben Linien unter unterschiedlichen Lichtbedingungen als (\*\*) bezeichnet. Eine unterschiedliche Skalierung wurde angewendet.

#### 4.13.3 Analyse der Pflanzen unter Bedingungen des „künstlichen Schattens“

Nicht alle der oben dargestellten Untersuchungen der Schattenvermeidungsreaktion in den dicht stehenden Pflanzen waren eindeutig. Um dies zu verifizieren, wurde ein Experiment geplant, in dem unter den strikt kontrollierten Bedingungen der Phytokammer eine Infrarotlampe zur Herstellung von „künstlichem Schatten“ verwendet wurde (Abb. 32). Die Anwendung der Infrarotlampe von 730 nm ermöglichte die Herabsetzung des für die normalen Lichtbedingungen charakteristischen hohen HR:DR (Hellrot:Dunkelrot) Verhältnisses. Dadurch wurde das für die Beschattungsbedingungen charakteristische niedrige HR:DR-Verhältnis erreicht. Pflanzen von transgenen Linien *StSUT4-RNAi*<sub>10</sub>, *StSUT4-RNAi*<sub>63</sub> und

*StSUT4*-RNAi<sub>81</sub> und WT wurden parallel unter Bedingungen des niedrigen HR:DR Verhältnisses und unter normalen Lichtbedingungen als Kontrolle angezogen.

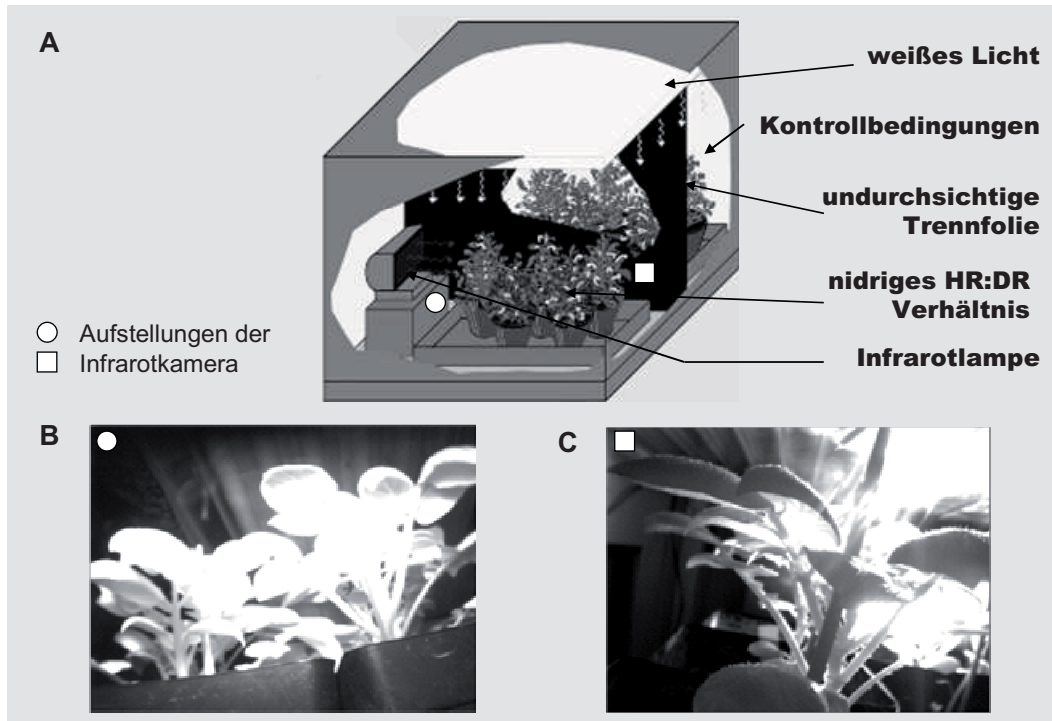


Abb. 32: Künstliches Beschattungsexperiment unter Verwendung einer zusätzlichen Infrarotlichtquelle A. Schema der Phytokammer mit 2 experimentellen Abteilungen für eine parallele Anzucht der Pflanzen unter künstlichen Schatten-Bedingungen (niedriges HR:DR Verhältnis) und unter normalen Lichtbedingungen (Kontrollbedingungen) B. und C. mit einer Infrarotkamera, im Dunkeln hergestellte Bilder von Pflanzen, die im Phytokammer-Abteil mit niedrigem HR:DR Verhältnis angezogen wurden B. Ansicht von vorne C. Ansicht von hinten.

Die Anzucht unter Bedingungen des niedrigen HR:DR Verhältnisses verursachte stärkeres Wachstum von Wildtyp Pflanzen im Vergleich zum WT unter normalen Lichtbedingungen. Die *StSUT4*-RNAi Pflanzen zeigten hingegen keinen Unterschied im Wachstum nach Belichtung mit einer zusätzlichen Infrarotlichtquelle im Vergleich zu den Kontrollbedingungen (Abb. 33 A). Die statistische Auswertung des Internodienwachstums bestätigte, dass die WT Pflanzen unter Bedingungen des niedrigen HR:DR Verhältnisses signifikant schneller als die Pflanzen unter normalen Lichtbedingungen wuchsen, während die transgenen Pflanzen keine signifikante Unterschiede im Wachstum unter unterschiedlichen Lichtbedingungen zeigten (Abb. 33 B).

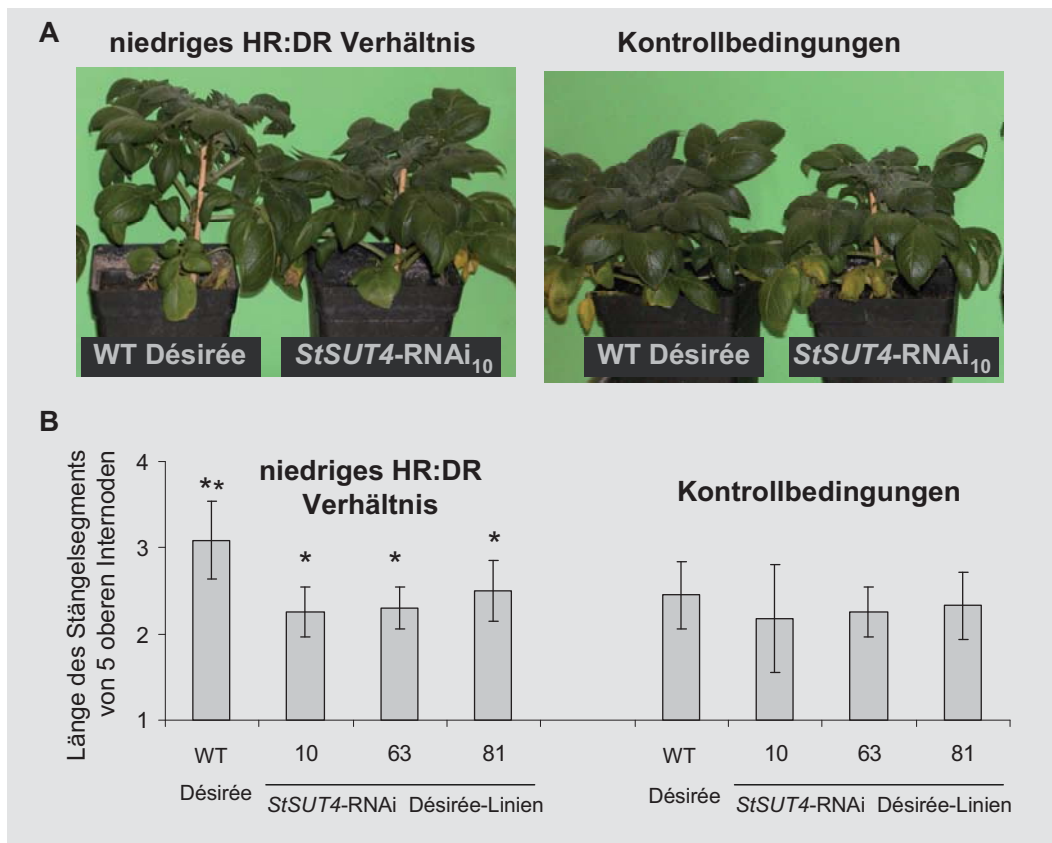


Abb. 33: Vergleich von *StSUT4*-RNAi und Wildtyp-Désirée Pflanzen unter Bedingungen des „künstlichen Schattens“ und unter normalen Lichtbedingungen im LT A. Aussehen der Pflanzen nach 5 Wochen B. Länge der 5 oberen Internodien. Es wurden die Werte  $\pm$  SD ( $n=3$ ) von einem repräsentativen Experiment dargestellt. Die Ergebnisse wurden in 2 unabhängigen Experimenten bestätigt. Die signifikanten Unterschiede ( $p<0,05$ ) zwischen transgenen und WT Pflanzen wurden als (\*) und zwischen denselben Linien unter unterschiedlichen Lichtbedingungen als (\*\*) bezeichnet.

#### 4.13.4 Untersuchungen der relativen Expression von Phytochromen

Untersuchungen des Transkriptgehalts von Phytochrom A und Phytochrom B, die an der Schattenvermeidungsreaktion beteiligt sind, wurden in *Source*-Blättern im LT durchgeführt. Es wurden Unterschiede im Transkriptlevel der beiden Phytochrome zwischen *StSUT4*-RNAi und WT Kartoffelpflanzen festgestellt (Abb. 34).

Die Transkriptakkumulation der beiden Phytochrome folgte sowohl beim WT wie auch bei den transgenen Pflanzen einem diurnalen Verlauf. Gegen 15 Uhr zeigten die untersuchten



*StSUT4*-RNAi Linien eine signifikant erhöhte Akkumulation der *PhyA*-Transkripte im Vergleich zum WT. In den transgenen Pflanzen wurden die *PhyB*-Transkripte am stärksten während der ersten Hälfte des Tages akkumuliert. Die Akkumulation der *PhyB*-Transkripte war meistens stärker in den transgenen als in WT Pflanzen. Statistische Auswertung hat dabei gezeigt, dass die Mehrzahl der Unterschiede signifikant war.

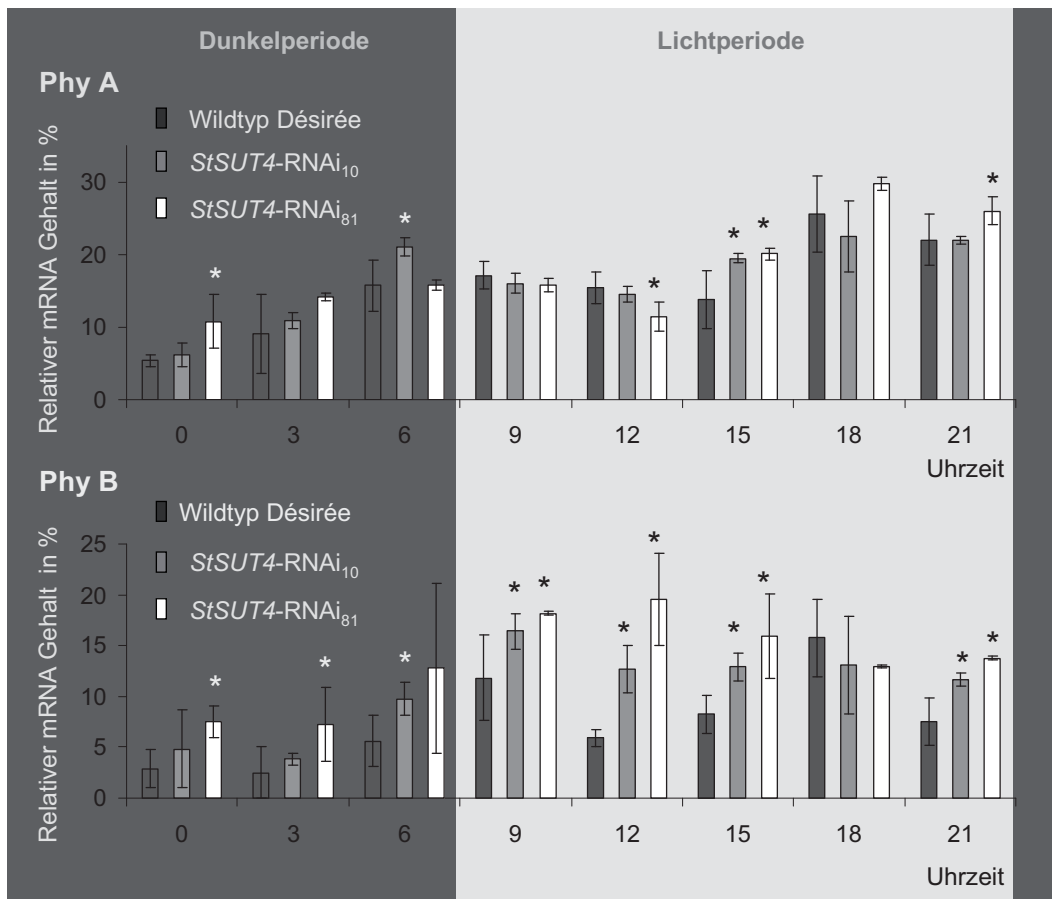


Abb. 34: Akkumulation der Phytochrom-Transkripte in *StSUT4*-RNAi und Wildtyp-Désirée unter LT-Bedingungen. Es wurden die Werte  $\pm$  SD ( $n > 3$ ) eines repräsentativen Experimentes dargestellt. Die Ergebnisse wurden in 2 unabhängigen Experimenten bestätigt. Die signifikanten Unterschiede zwischen transgenen und Wildtyp Pflanzen wurden als (\*) für  $p < 0,05$  bezeichnet. Eine unterschiedliche Skalierung wurde angewendet.

#### 4.14 Analyse der photosynthetischen Prozesse

Da die Veränderungen der Lichtbedingungen die Photosynthese beeinflussen, was wiederum Veränderungen des Kohlenstoffmetabolismus verursacht, wurden Analysen von photosynthetischen Prozessen in *StSUT4*-RNAi Pflanzen vorgenommen, die entweder unter normaler Belichtung oder im Schatten wuchsen.

Analyse der Chlorophyll-Fluoreszenz ist eine Methode, die über die photochemischen Prozesse, insbesondere über die Aktivität von PSII Aufschluss gibt. Mit Hilfe eines PAM-Fluorometers wurden freundlicherweise von Frau Dr. Yvonne Pörs folgende Chlorophyll-Fluoreszenz-Parameter analysiert: Grundfluoreszenz ( $F_0$ ), terminale Fluoreszenz bei *steady-state* Photosynthese nach Lichtadaptation ( $F_t$ ), maximale Fluoreszenz nach Dunkeladaptation ( $F_m$ ), maximale Fluoreszenz im Verlauf der Dauerbelichtung ( $F_m'$ ), relative Quantenausbeute (*yield*) und maximale Quantenausbeute des PSII ( $F_v/F_m$ ,  $\Phi_{max}$ ). Die Chlorophyll-Fluoreszenz in oberen und unteren Blättern von dicht- und weit auseinander stehenden Pflanzen wurde gemessen. Dabei wurden keine signifikanten Unterschiede in der photosynthetischen Aktivität zwischen den transgenen und WT Pflanzen festgestellt. Auch die von Frau Dr. Yvonne Pörs durchgeführten Analysen der Absorption, Transmission und Reflexion des Lichtes von oberen und unteren Blättern der Pflanzen unter normalen Lichtbedingungen, sowie im Schatten haben keine signifikante Unterschiede zwischen *StSUT4*-RNAi und WT Pflanzen gezeigt. Mit der spektrophotometrischen Methode und mit HPLC wurde die Analyse des Chlorophyllgehalts durchgeführt. Es wurden keine signifikanten Veränderungen des Chlorophyllgehalts in transgenen Pflanzen festgestellt (Daten nicht präsentiert).

#### 4.15 Analyse des Carotinoidgehalts

Mittels HPLC wurde parallel zur Chlorophyllgehaltsanalyse die quantitative Bestimmung der Carotenoide durchgeführt. Während keine signifikanten Unterschiede im Carotenoidgehalt zwischen oberen Blättern von weit und dicht stehenden transgenen und WT Pflanzen gemessen

sen wurden (Daten nicht präsentiert), war der Carotenoidgehalt in unteren Blättern von belichteten und beschatteten transgenen Pflanzen im Vergleich zum WT signifikant verändert (35).

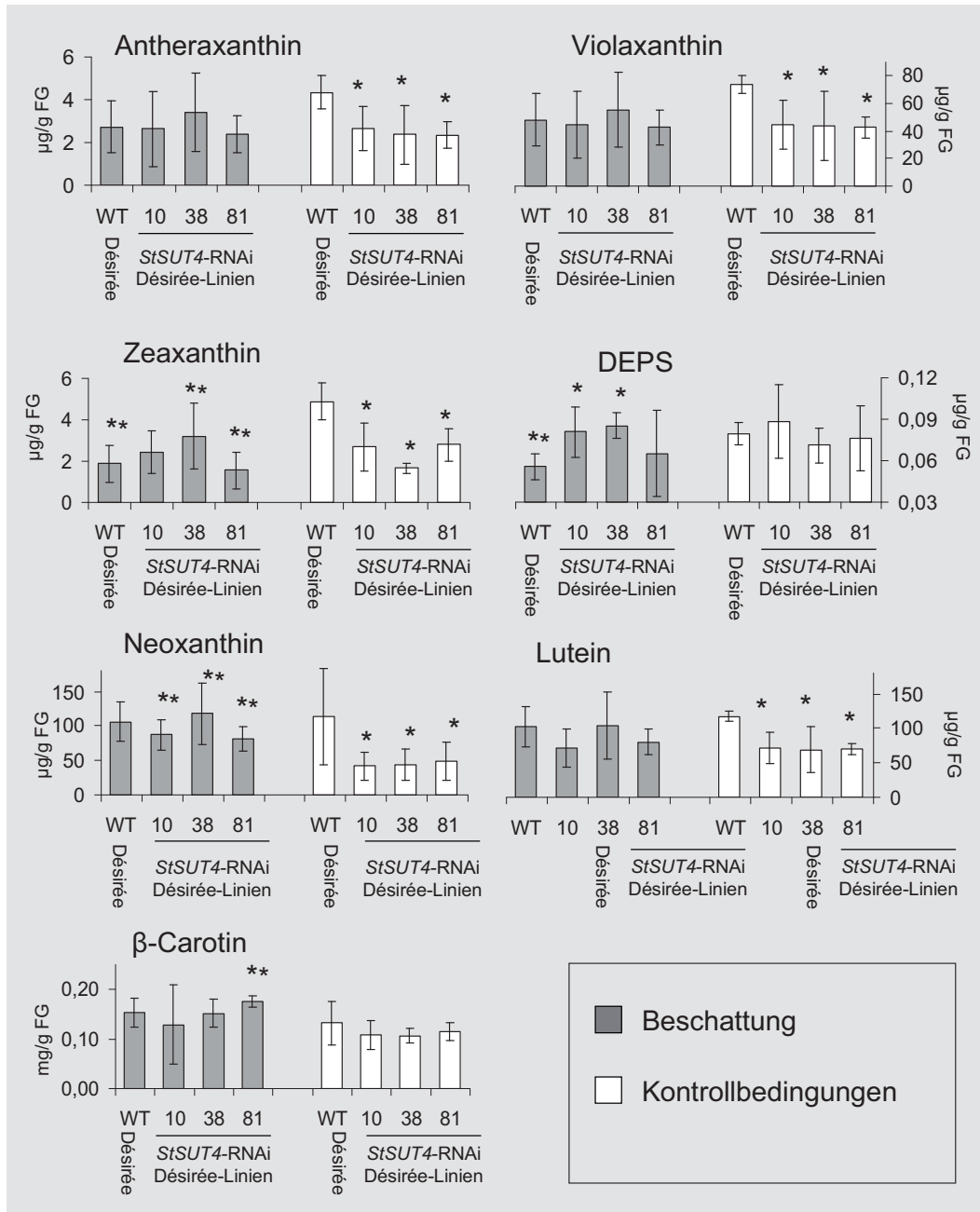


Abb. 35: Analyse des Carotinoidgehalts in *StSUT4-RNAi* und Désirée Wildtyp-Pflanzen im LT. Es wurden die Werte  $\pm$  SD ( $n > 3$ ) eines repräsentativen Experiments dargestellt. Die Ergebnisse wurden in 2 unabhängigen Experimenten bestätigt. Die signifikanten Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen transgenen und WT Pflanzen wurden als (\*) und zwischen denselben Linien unter unterschiedlichen Lichtbedingungen als (\*\*) bezeichnet. Eine unterschiedliche Skalierung wurde angewendet.

Der signifikant reduzierte Gehalt von Carotenoiden des Xanthophyll-Zyklus (Antheraxanthin (A), Violaxanthin (V) und Zeaxanthin (Z)) bei den belichteten transgenen Linien äußerte sich nicht im veränderten De-Epoxidations-Status ( $DEPS=(Z+0,5A)/(V+A+Z)$ ). Während der DEPS-Wert bei den dicht wachsenden WT-Pflanzen signifikant niedriger als bei den belichteten WT-Pflanzen ist, wurden keine DEPS-Veränderungen zwischen den dicht und weit auseinander stehenden *StSUT4*-RNAi Pflanzen beobachtet. Im Schatten war der DEPS-Wert bei den transgenen Linien 10 und 38 signifikant höher als beim WT.

#### 4.16 Analyse des Anthocyanengehalts

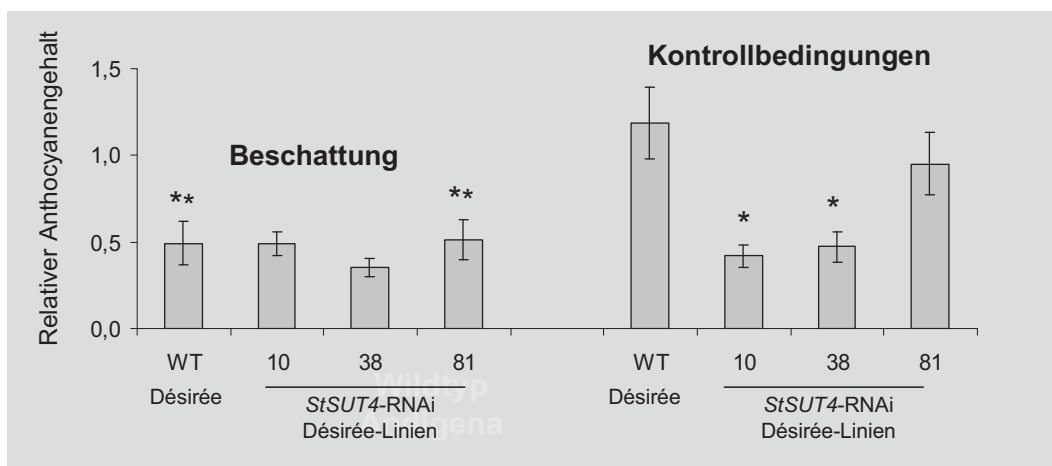


Abb. 36: Analyse des Anthocyanengehalts in *StSUT4*-RNAi und Désirée Wildtyp-Pflanzen unter LT-Bedingungen. Die Werte  $\pm$  SD ( $n>3$ ) eines repräsentativen Experiments sind dargestellt. Die Ergebnisse wurden in 2 unabhängigen Experimenten bestätigt. Die signifikanten Unterschiede ( $p<0,05$ ) zwischen transgenen und WT Pflanzen wurden als (\*) und zwischen denselben Linien unter unterschiedlichen Lichtbedingungen als (\*\*) bezeichnet.

Der relative Gehalt der wichtigsten Flavonoidpigmente, Anthocyane, in *Source*-Blättern wurde spektrophotometrisch bestimmt (Abb. 36). Bei den weit auseinander stehenden Pflanzen steigt die Anthocyankonzentration in WT-Pflanzen signifikant an, während in den *StSUT4*-RNAi Pflanzen die Anthocyankonzentration auf einem geringen Level verbleibt, der dem der beschatteten Pflanzen entspricht (mit Ausnahme der Linie 81). In beschatteten Blättern der *StSUT4*-RNAi-Pflanzen war der Anthocyanengehalt im Vergleich zum WT unverändert.

#### 4.17 Schattenvermeidungsreaktion in Tabakpflanzen mit *SUT1*-Überexpression

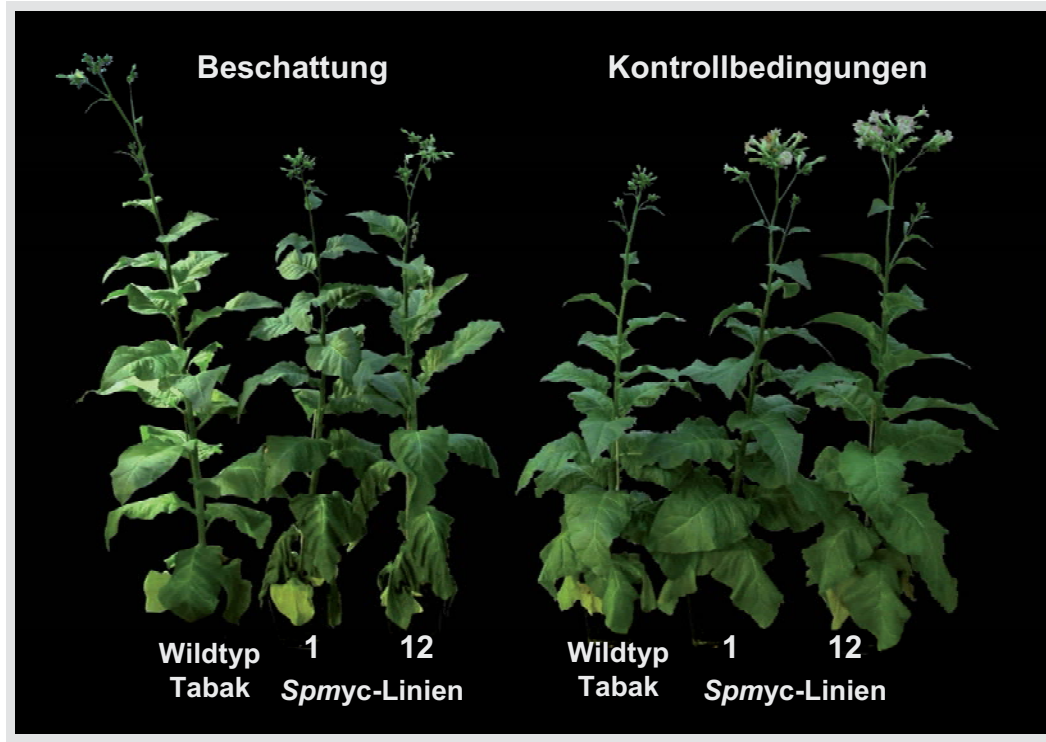


Abb. 37: Vergleich des Phänotyps von dicht (beschattet; links) und weit auseinander stehenden (Kontrolle; rechts) WT und *Spmyc*-Tabakpflanzen. Das Experiment wurde im LT durchgeführt. Die Ergebnisse wurden in 2 unabhängigen Experimenten bestätigt.

Die bisher beschriebenen Experimente wurden mit transgenen Pflanzen mit reduzierter *SUT4*-Expression durchgeführt. Ein vergleichbarer Phänotyp wurde bereits für transgene Tabakpflanzen beschrieben, die das *SUT1* Gen aus *Spinacia oleracea*, *SoSUT1* mit c-myc tag unter Kontrolle des CaMV 35S-Promotors überexprimieren (Riesmeier und Frommer, 1994). Ähnlich wie im Fall der *StSUT4*-RNAi Kartoffelpflanzen wurde auch in den *Spmyc*-Tabakpflanzen ein vorzeitiges Erblühen und eine Tendenz zu gedrungenem Wuchs beschrieben (Riesmeier und Frommer, 1994; Leggewie, 1996). Das Auftreten und die Intensität der bei den *Spmyc*-Tabakpflanzen beobachtenden Effekte war stark von der Jahreszeit abhängig, was auf eine Abhängigkeit des Effekts von Lichtbedingungen hinweist (Leggewie, 1996). Bei den *StSUT4*-RNAi Kartoffelpflanzen wurde auch die Abhängigkeit des Phänotyps von den

Lichtbedingungen beobachtet (Kap. 4.13). Um zu klären, ob die in *StSUT4*-RNAi Kartoffelpflanzen beobachtete verringerte Schattenvermeidungsantwort auch für *Spmyc*-Tabakpflanzen zutrifft, wurde ein Experiment geplant, in dem das Verhalten von dicht- und weit auseinander stehenden *Spmyc*-Tabakpflanzen miteinander verglichen wurde (Abb. 37).

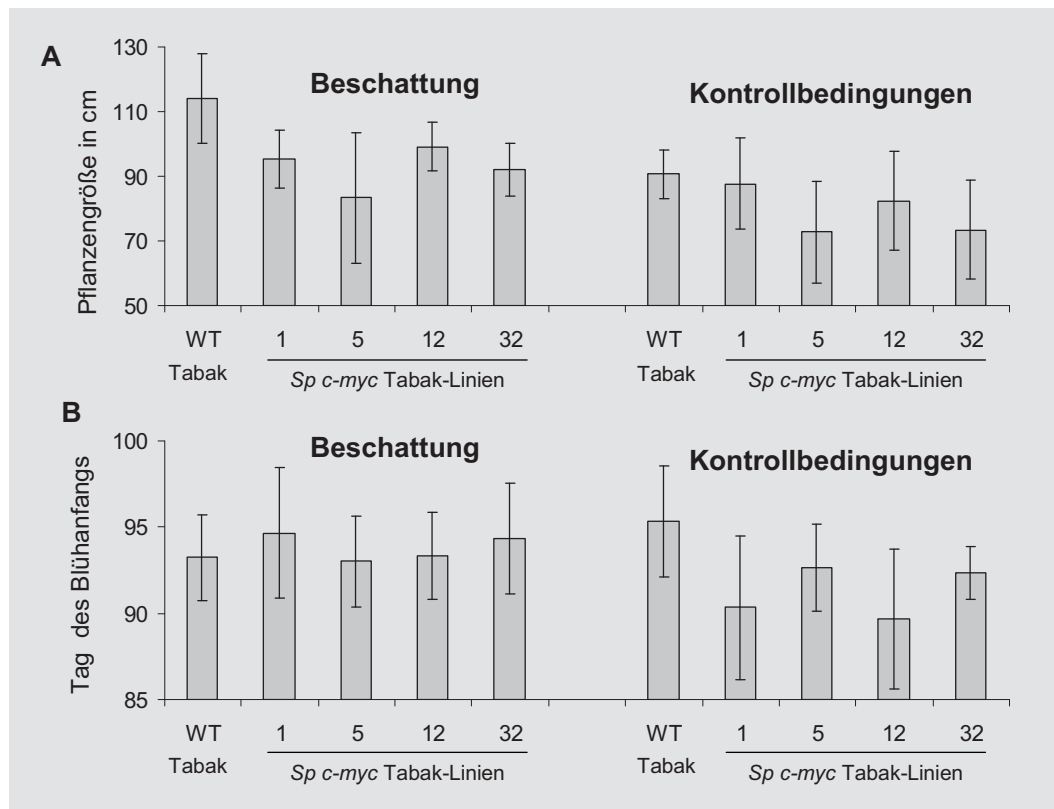


Abb. 38: Analyse des Phänotyps von belichteten und beschatteten transgenen *Spmyc*- und WT Tabakpflanzen. Das Experiment wurde im LT durchgeführt A. Pflanzengröße B. Blühverhalten. Es wurden gemittelte Werte  $\pm$  SD ( $n \geq 3$ ) von einem Experiment dargestellt. Eine unterschiedliche Skalierung wurde angewendet.

Die im Rahmen der Doktorarbeit von Georg Leggewie hergestellten *Spmyc*-Tabakpflanzen (Riesmeier und Frommem, 1994; Leggewie, 1996), wurden mir freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Während die WT Tabakpflanzen im Schatten viel höher als der unbeschattete WT wuchsen, waren bei den *Spmyc*-Tabakpflanzen nur sehr geringe Unterschiede im Wachstum bei unterschiedlicher Belichtung zu beobachten (Abb. 38 A). Unter normalen Lichtbedingungen im LT kamen die transgenen *Spmyc*-Tabakpflanzen früher zur Blüte als der WT (Abb. 38 B). Im Schatten war dieses Phänomen jedoch nicht mehr zu beobachten.

## 4.18 Untersuchungen der Pflanzen unter KT-Bedingungen

Die bisher beschriebenen Analysen wurden unter Langtag-Bedingungen durchgeführt. Unter diesen Bedingungen zeigen die mit dem *StSUT4*-RNAi-Konstrukt modifizierten Kartoffelpflanzen eine im Vergleich zum WT erhöhte Knollenproduktion. Es ist bekannt, dass die Knollenbildung bei Kartoffelpflanzen durch die LT-Photoperiode verzögert wird, während die KT-Photoperiode die Produktion dieser vegetativen Vermehrungsorgane fördert (Rodríguez-Falcón *et al.*, 2006). Die Analyse von *StSUT4*-RNAi Kartoffellinien in der Phytokammer mit 16stündiger Dunkelheit und 8stündigem Licht wurde durchgeführt, um zu klären, ob die unter LT-Bedingungen beschriebenen Phänotypveränderungen von *StSUT4*-RNAi Kartoffelpflanzen von der Photoperiode abhängig sind.

### 4.18.1 Phänotyp

Außer dem in *StSUT4*-RNAi Kartoffeln im Vergleich zum WT verringerten Internodienwachstum waren keine wesentlichen Veränderungen im Aussehen der im KT angezogenen Pflanzen zu beobachten (Daten nicht präsentiert, Abb. 39 A). Im KT waren alle untersuchten Pflanzen unfähig zu blühen. Zwei Monate nach Beginn der Anzucht unter Kurztagbedingungen wurde der Knollenertrag bestimmt. Es wurden keine Unterschiede für den Zeitpunkt der Knolleninduktion zwischen transgenen und Wildtyp Pflanzen unter KT-Bedingungen beobachtet. Es wurde kein signifikanter Unterschied zwischen dem Gesamtgewicht der Knollen pro Pflanze festgestellt (Abb. 39 B). Die Morphologie der Knollen von *StSUT4*-RNAi und WT Kartoffeln war sehr ähnlich.



Abb. 39: Phänotyp der *StSUT4*-RNAi und Désirée WT-Pflanzen im KT A. Internodienwachstum B. Knollenertrag. Die Werte  $\pm$  SE ( $n > 3$ ) eines repräsentativen Experiments sind dargestellt. Die Ergebnisse wurden in 2 unabhängigen Experimenten bestätigt. Die signifikanten Unterschiede zwischen transgenen und WT Pflanzen wurden als (\*) für  $p < 0,05$  bezeichnet. C. Aussehen der Knollen.

#### 4.18.2 Zuckerbestimmung

Die Veränderungen des Kohlenhydratprofils in den *Source*-Blättern von KT-Kartoffeln wurde analysiert. Die Untersuchungen umfassten 3 Zeitpunkte der Lichtperiode und eine zusätzliche Probe zu Beginn der Dunkelperiode.

Die Konzentrationen der beiden Hexosen, Fruktose und Glukose, in den *StSUT4*-RNAi Kartoffel-*Source*-Blättern waren in der ersten Hälfte des Tages höher und am Anfang der Nacht niedriger als beim WT (Abb. 40). Der Saccharosegehalt von *StSUT4*-RNAi Pflanzen war zu allen analysierten Zeitpunkten erhöht im Vergleich zum WT (meistens signifikant). Maximale



Werte des Saccharosegehalts wurden in der Mitte des Tages festgestellt, und zu diesem Zeitpunkt wurden auch die höchsten Unterschiede zwischen Saccharosekonzentration im WT und in transgenen Pflanzen beobachtet.

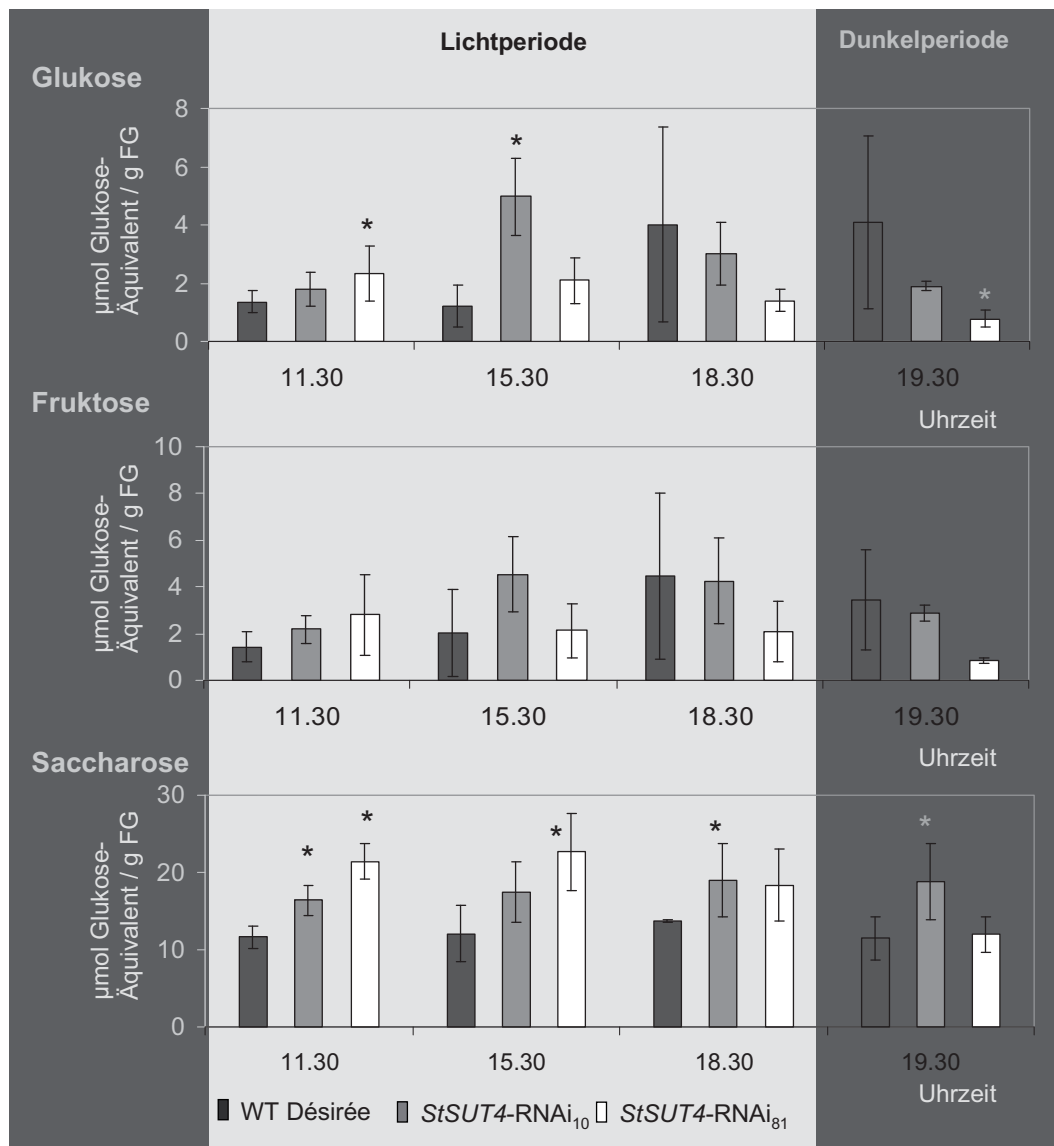


Abb. 40: Enzymatische Bestimmung der löslichen Zucker in *Source*-Blättern von *StSUT4-RNAi* und Wildtyp Désirée-Pflanzen unter KT-Bedingungen. Die Analysen erfassten 3 Zeitpunkte der 8h Lichtperiode und einen Zeitpunkt am Anfang der Dunkelperiode um. Es wurden gemittelte Werte  $\pm$  SE (n=3) von einem repräsentativen Experiment dargestellt. Die Ergebnisse wurden in 2 unabhängigen Experimenten bestätigt. Die signifikanten Unterschiede zwischen transgenen und Wildtyp Pflanzen wurden als (\*) für  $p < 0,05$  bezeichnet. Eine unterschiedliche Skalierung wurde angewendet.

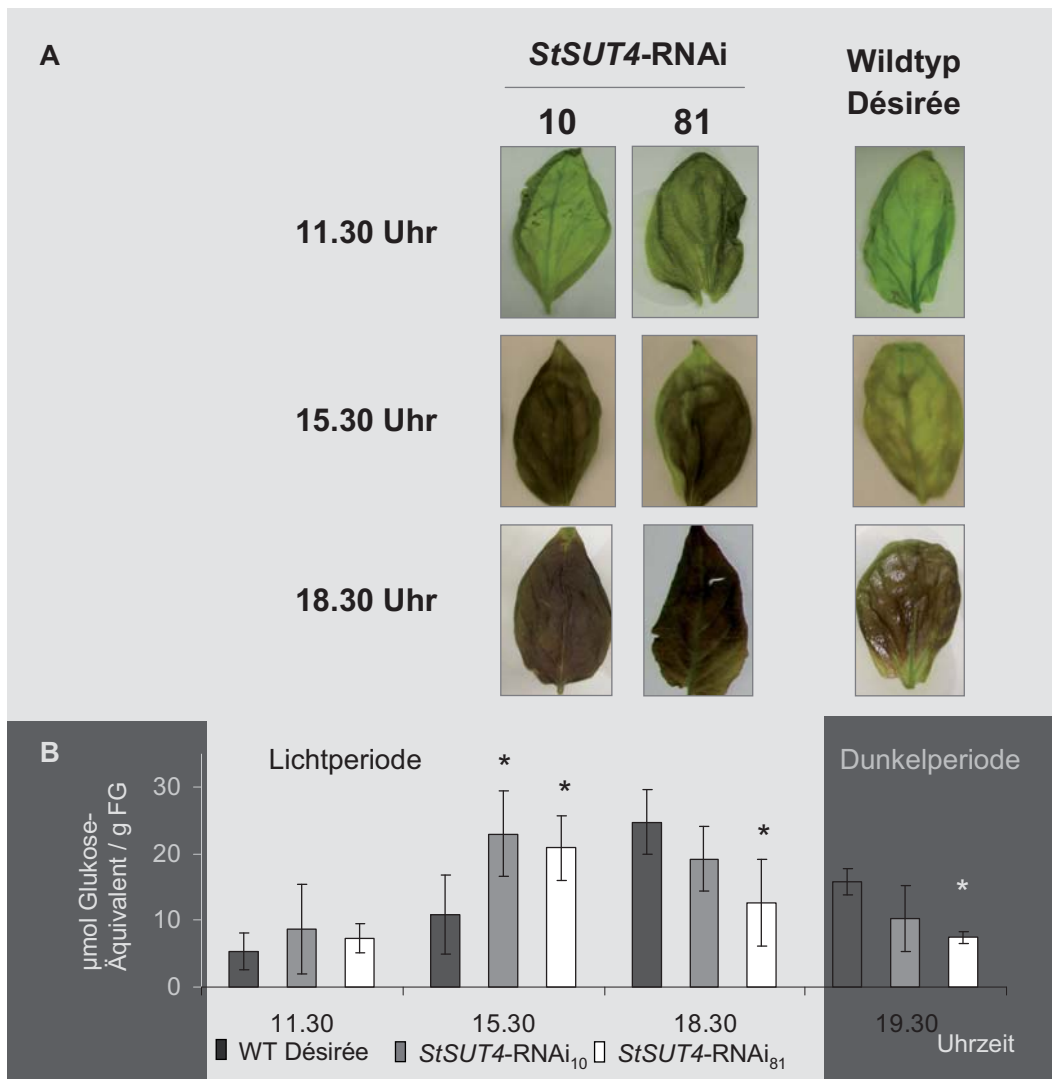


Abb. 41: Qualitative und quantitative Bestimmung des Stärke-Gehalts in *StSUT4-RNAi* und Wildtyp *Source*-Blättern unter KT-Bedingungen A. Blätter nach Stärkefärbung B. Enzymatische Bestimmung der Stärke. Die Analyse umfasste 3 Zeitpunkte der 8h Lichtperiode und ein Zeitpunkt zu Beginn der Dunkelperiode. Es wurden gemittelte Werte  $\pm$  SE (n=3) von einem repräsentativen Experiment dargestellt. Die Ergebnisse wurden in 2 unabhängigen Experimenten bestätigt. Die signifikanten Unterschiede zwischen transgenen und Wildtyp Pflanzen wurden als (\*) für  $p < 0,05$  bezeichnet.

Die am Anfang des Tages durchgeführte Stärke-Färbung hat keine signifikanten Unterschiede im Stärkegehalt der *StSUT4-RNAi* und WT Blätter gezeigt, was auch durch die enzymatischen Messungen bestätigt wurde (Abb. 41). Die beiden Methoden zeigten, dass es in der Mitte der Lichtperiode wesentlich mehr Stärke in den *StSUT4-RNAi* *Source*-Blättern als in den WT Blättern gab. Durch enzymatische Stärkebestimmung wurde in den *StSUT4-RNAi* Blättern der maximale Stärkegehalt in den Mittagsstunden festgestellt. Der maximale Stärkegehalt beim WT zeigte sich dagegen erst gegen Ende der Lichtperiode und wies deutlich hö-

here Werte auf als bei den transgenen Pflanzen (signifikant im Fall der Linie *StSUT4*-RNAi<sub>81</sub>). Am Anfang der Dunkelperiode wurde bei allen untersuchten Pflanzen eine Reduktion des Stärkegehalts beobachtet, dabei zeigten die WT Blätter einen signifikant höheren Stärkegehalt als die Blätter der transgenen Pflanzen

#### 4.18.3 Saccharose-Efflux

Meistens hat die Efflux-Messung keine signifikanten Unterschiede im KT zwischen *StSUT4*-RNAi und WT Pflanzen gezeigt (Abb. 42). Die maximalen Werte der Saccharose-Effluxrate wurden in WT Pflanzen gegen Mitte des Kurztags beobachtet. In den transgenen *StSUT4*-RNAi Pflanzen dagegen war die maximale Saccharose-Effluxrate tendenziell zu einem späteren Tageszeitpunkt (am Nachmittag und am Anfang der Dunkelperiode) zu beobachten.

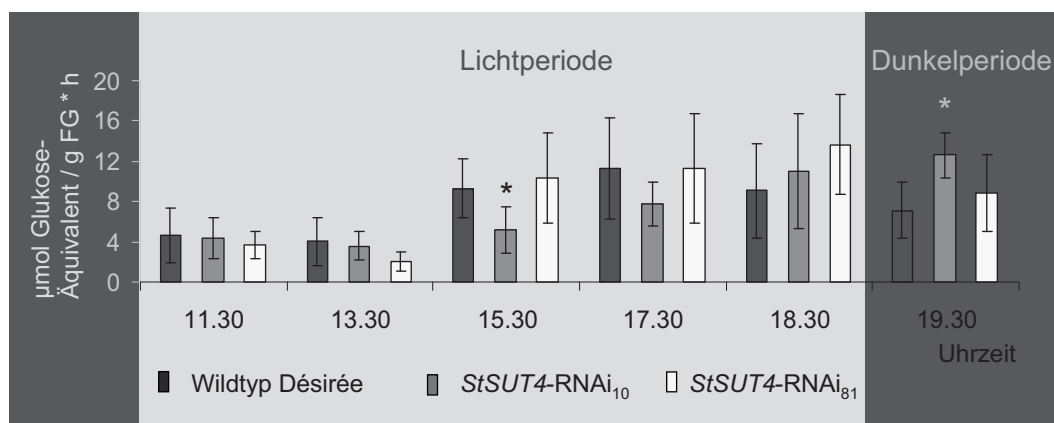


Abb. 42: Verlauf des Saccharose-Efflux von *StSUT4*-RNAi und Wildtyp *Source*-Blättern im KT. Die auf der X-Achse dargestellte Uhrzeit bezeichnet den Moment der Aufnahme von Phloemexudaten, die durch eine vorherige Stunde gesammelt wurden. Es wurden die Werte  $\pm$  SE (n=3) von einem repräsentativen Experiment dargestellt. Die Ergebnisse wurden in 2 unabhängigen Experimenten bestätigt. Die signifikanten Unterschiede zwischen transgenen und Wildtyp Pflanzen wurden als (\*) für  $p < 0,05$  bezeichnet.

#### 4.18.4 AGPase Bestimmung

In einem weiteren Experiment sollte geklärt werden, ob der veränderte Stärkegehalt in den Blättern der *StSUT4*-RNAi Pflanzen auf vermehrter Stärkesynthese oder verringertem Stärkeabbau beruht. Eine bedeutende Rolle an der Steuerung der Stärke-Biosynthese in Blättern und in Knollen hat die posttranslationale Redox-Regulation der ADP-Glucosepyrophosphorylase (AGPase), die ein Schlüsselenzym des Stärkeaufbaus ist (Müller-Röber *et al.*, 1992; Geigenberger, 2003; Tiessen *et al.* 2002; Hendriks *et al.* 2003; Geigenberger, 2003). AGPase ist Heterotetramer, das aus 2 größeren Einheiten (AGPS, 51 kDa) und aus 2 kleineren Einheiten (AGPB, 50 kDa) besteht (berichtet in Kolbe *et al.* 2005). Infolge einer Ausbildung von Disulfid-Brücken zwischen den AGPB kommt es zur reversiblen Homodimerisierung (oxidierte Enzymform) und zur Inaktivierung des Enzyms (Tiessen *et al.* 2002).

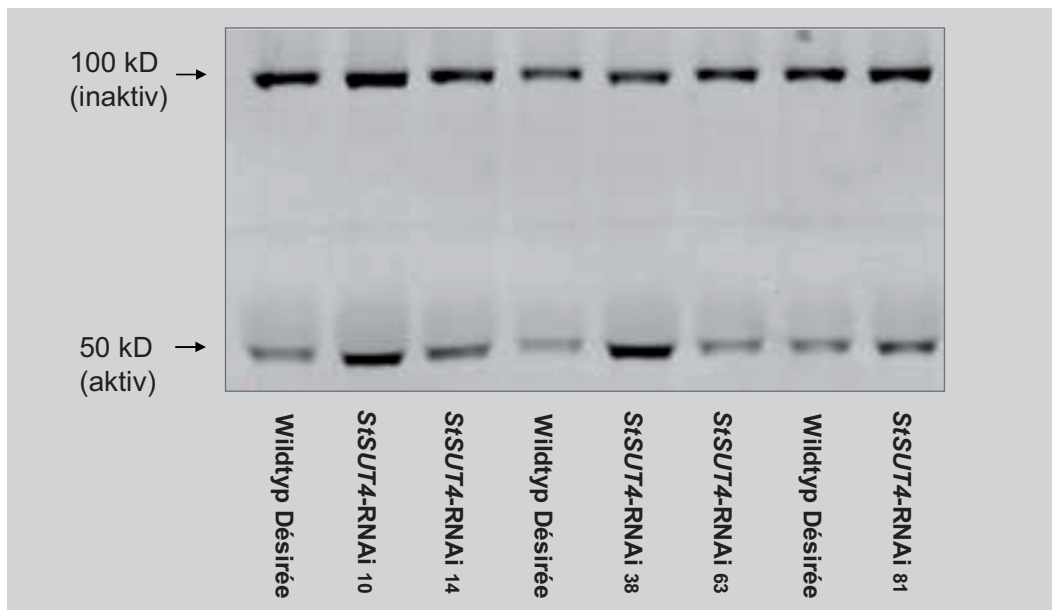


Abb. 43: Protein-Gel-Blot-Analyse von AGPase in Kurztag-*Source*-Blättern von *StSUT4*-RNAi und Wildtyp-*Désirée*. Der höchste Gehalt von aktiver (reduzierter) Monomerform wurde im Fall von Linien *StSUT4*-RNAi<sub>10</sub> und *StSUT4*-RNAi<sub>38</sub> festgestellt. SDS-PAGE wurde ohne DTT im Probenpuffer durchgeführt.

Über Western Blots kann der Aktivierungszustand der ADP-Glucosepyrophosphorylase (AGPase) analysiert werden. Die Untersuchungen zur AGPase-Aktivierung wurden freundlicher-

weise von der AG von Peter Geigenberger durchgeführt. Da die deutlichsten Unterschiede im Stärkegehalt mittags unter KT-Bedingungen beobachtet wurden wurde dieses Blattmaterial für die AGPase-Analyse verwendet. Die Ergebnisse haben Unterschiede im Gehalt der aktiven (reduzierten) und inaktiven (oxidierten) Enzymform in den Blättern von untersuchten Linien gezeigt (Abb. 43). Im Vergleich zum WT wiesen die Blätter aller untersuchten transgenen Linien vermehrt die monomere Form der AGPB Untereinheit auf, was auf eine vermehrte Stärkesynthese aufgrund einer Redox-Aktivierung der AGPase hindeutet. Der höchste Gehalt der reduzierten Form wurde in den Proben von Linien *StSUT4*-RNAi<sub>10</sub> und *StSUT4*-RNAi<sub>38</sub> beobachtet.

## 4.19 Analyse der Blühinduktionsfaktoren

In den bisher dargestellten Experimenten wurden die in *StSUT4*-RNAi Kartoffelpflanzen veränderten Parameter in den *Source*-Blättern, die für frühere Blühinduktion bedeutend sein können, bereits eingehend untersucht. Weitere Untersuchungen sollen zeigen, ob auch Prozesse direkt im Apex betroffen sind und ob die Expression bekannter und nachgewiesenermaßen an der Blühinduktion beteiligter Gene in den *StSUT4* RNAi Pflanzen eine veränderte Expression aufweisen.

### 4.19.1 Saccharose-Bestimmung in Apex

Eine Korrelation zwischen Veränderungen der Saccharosekonzentration im Apex und der Induktion der generativen Entwicklungsphase wurde bisher bei vielen Pflanzen festgestellt (Havelange *et al.*, 2001; Bernier und Périlleux, 2005; Eriksson *et al.*, 2006). Um zu prüfen, ob möglicherweise ein veränderter Saccharosetransport bei den transgenen Kartoffelpflanzen mit reduzierter *SUT4*-Expression zu frühzeitiger Blühinduktion führt, wurden detaillierte Analysen zur Abhängigkeit der Saccharosekonzentration in apikalen Sprossmeristem vom Entwicklungszustand der Pflanzen vorgenommen. Die Analysen umfassten 7 Gruppen von Pflanzen mit unterschiedlicher Anzahl von *Source*- Blättern (Abb. 44 A). Die Bestimmung der Entwicklungsphasen der Apices jeder experimentellen Pflanzengruppe hat gezeigt, dass die

*StSUT4*-RNAi Pflanzen beim Übergang von vegetativer zu generativer Entwicklungsphase etwa 5-6 *Source*-Blätter aufwiesen, während WT Pflanzen zum Zeitpunkt der Blühinduktion bereits 10 Blätter aufwiesen.

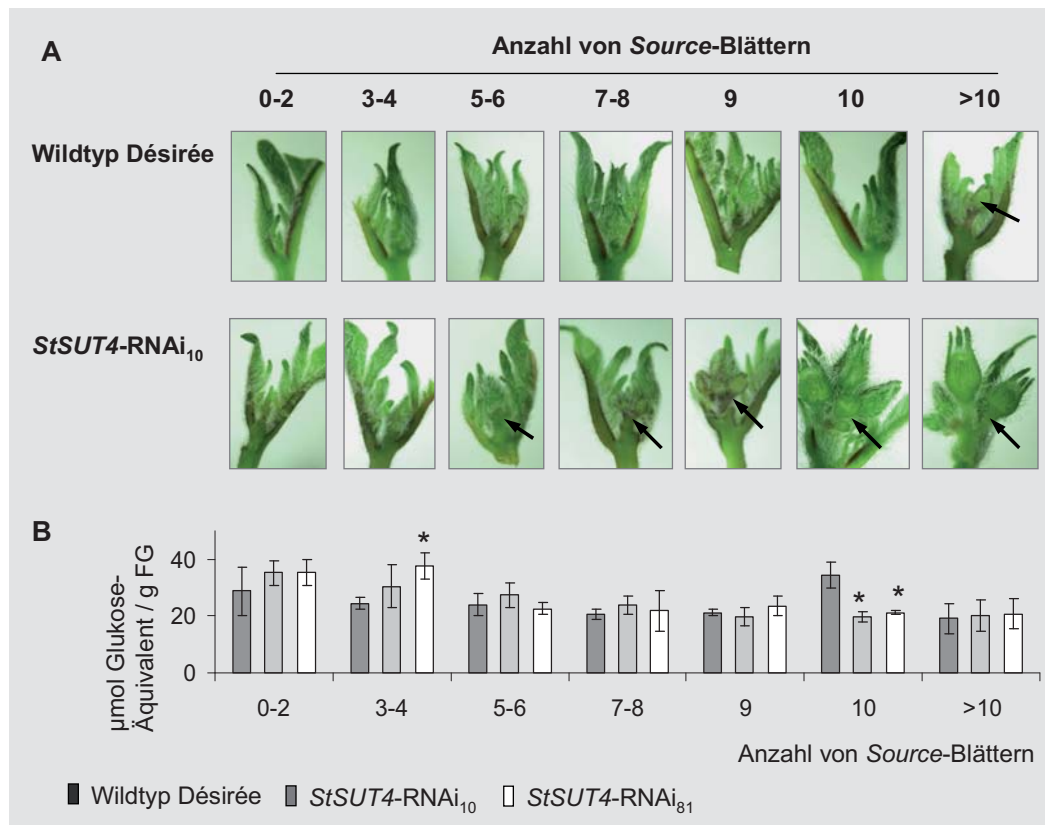


Abb. 44: Untersuchung des Saccharosegehalts in Apices während der Entwicklung von *StSUT4*-RNAi und Wildtyp Désirée-Pflanzen im LT. A. Bestimmung der Apex-Entwicklungsphase abhängig von der *Source*-Blätter-Anzahl. Die Pfeile zeigen kleine Blütenknospen B. Enzymatische Saccharose-Bestimmung in Apices der Pflanzen abhängig von der Anzahl der *Source*-Blätter. Es wurden gemittelte Werte  $\pm$  SE (n=3) eines repräsentativen Experiments dargestellt. Die Ergebnisse wurden in 2 unabhängigen Experimenten bestätigt. Die signifikanten Unterschiede zwischen transgenen und Wildtyp Pflanzen wurden als (\*) für  $p < 0,05$  bezeichnet

Diese Veränderung der Entwicklungsphase korrelierte mit zeitlicher Veränderung der Saccharosekonzentrationen im Sprossmeristem von transgenen und WT Pflanzen. Die höchsten Saccharose-Werte wurden in den jüngsten Pflanzen beobachtet (Abb. 44 B). Die Saccharosekonzentration war dabei in den jungen transgenen Pflanzen höher als beim WT. Im Fall der Linie *StSUT4*-RNAi<sub>81</sub> war diese Erhöhung in den Pflanzen mit 3-4 Blättern, also kurz bevor die Pflanzen von vegetativer zur generativen Entwicklungsphase übergehen, signifikant. Danach

blieb die Saccharosekonzentration während der weiteren Entwicklung der transgenen Pflanzen auf einem konstant niedrigen Niveau. Im Sprossmeristem von WT-Pflanzen mit 10 *Source*-Blättern, kurz bevor die WT Pflanzen in die generative Entwicklungsphase übergangen, wurde eine kurzfristige Steigerung der Saccharosekonzentration beobachtet. Der Saccharosegehalt der transgenen Pflanzen mit 10-*Source*-Blättern blieb niedriger.

#### 4.19.2 Analyse von Blühinduktionsgenen

Die wichtige Rolle der Gene *CONSTANS (CO)*, *FT* und *SOC1* für die Blühinduktion ist u.a. in *Arabidopsis* gut untersucht (Bernier und Périlleux, 2005; Corbesier und Coupland, 2006; Johnson *et al.*, 2008). Homologe Gene dieser in *Arabidopsis* beschriebenen Blühfaktoren könnten in Kartoffeln auch für die Knolleninduktion essentiell sein (Rodríguez-Falcón *et al.*, 2006). Die Untersuchung der Transkriptakkumulation von vier putativen Blühfaktor-Homologen aus Kartoffeln: *StFT*, *StCOL1* sowie *StCOL3* (*CO*-Homolog) und *StSOC1* (Martínez-García *et al.*, 2002b; Drobyazina und Khavkin, 2006; Rodríguez-Falcón *et al.*, 2006), wurden über *real time* PCR Analyse in *Source*-Blättern von *StSUT4*-RNAi und Wildtyp Kartoffeln unter LT-Bedingungen quantifiziert.

Im Fall von *StCOL3* waren vor allem in der Nacht sowie am Ende der Lichtperiode signifikant weniger Transkripte im Vergleich zum WT nachweisbar (Abb. 45). Am Anfang der Lichtperiode wurde das Maximum der Transkriptakkumulation in Blättern von sowohl transgenen wie auch WT Pflanzen festgestellt. Die maximalen Werte der *StCOL3*-mRNA-Akkumulation wurden am Anfang der Lichtperiode festgestellt und in den *StSUT4*-RNAi<sub>81</sub> Blättern waren signifikant geringer als im WT. Die relative Expression des zweiten *CO*-Homologs, *StCOL1*, war in den *Source*-Blättern der *StSUT4*-RNAi Linien zu allen untersuchten Zeitpunkten ebenfalls reduziert (meistens signifikant).

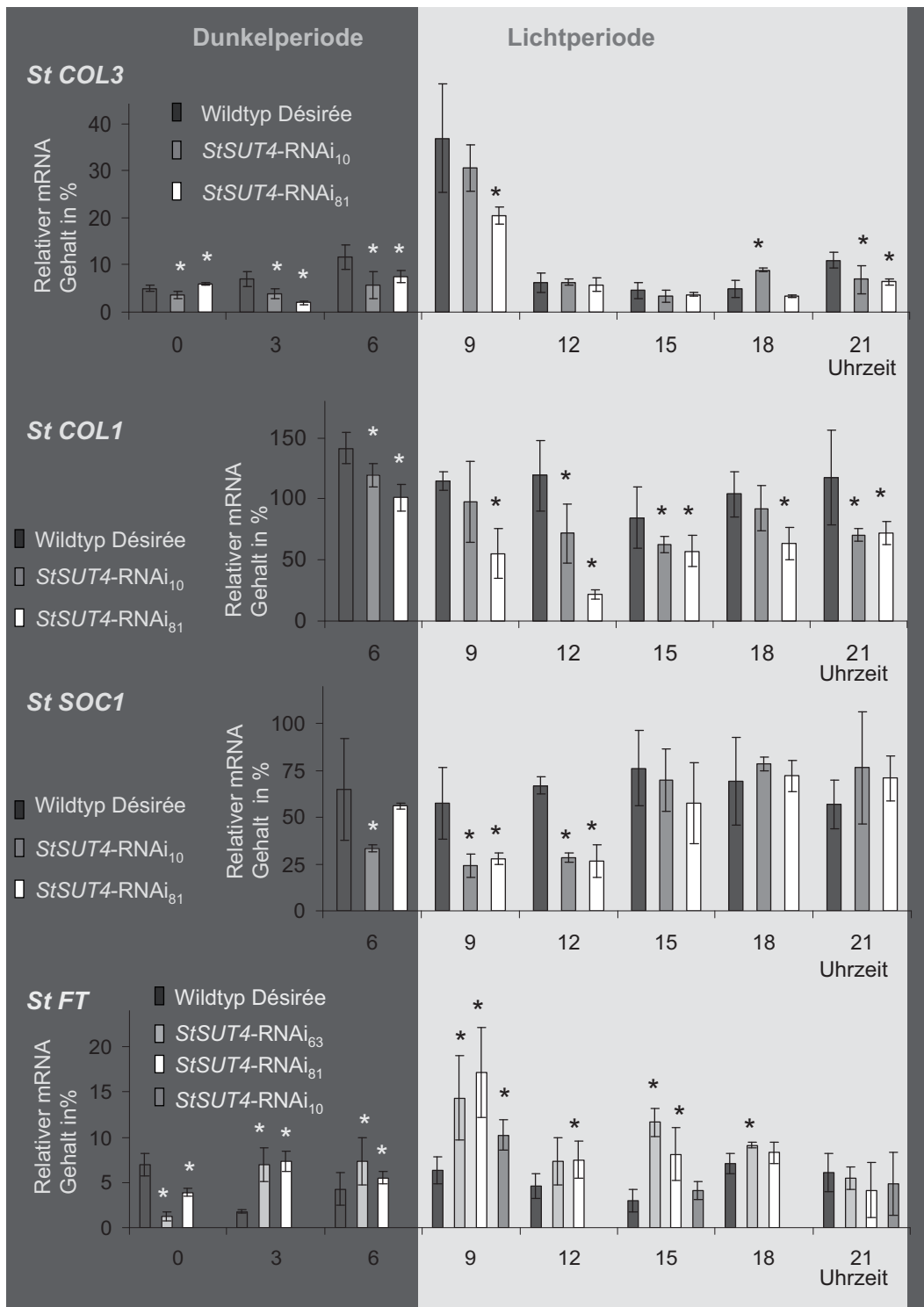


Abb. 45: Quantifizierung der Transkripte der Blühfaktoren *COL3*, *COL1*, *SOC1* und *FT* in *StSUT4-RNAi* und Wildtyp Désirée-Pflanzen unter LT-Bedingungen durch *real time* PCR. Gemittelte Werte  $\pm$  SE ( $n \geq 3$ ) eines repräsentativen Experiments sind dargestellt. Die Ergebnisse wurden in 2 unabhängigen Experimenten bestätigt. Die signifikanten Unterschiede zwischen transgenen und Wildtyp Pflanzen wurden als (\*) für  $p < 0,05$  bezeichnet. Eine unterschiedliche Skalierung wurde angewendet.



Am Ende der Dunkelperiode und zu Beginn des Tages wurden in den transgenen Pflanzen signifikant weniger *StSOC1*-Transkripte nachgewiesen als beim WT. In der zweiten Hälfte des Tages stiegen die *StSOC1*-Transkriptmengen und waren in *StSUT4*-RNAi und WT Pflanzen schliesslich vergleichbar.

Im Gegensatz zu den oben beschriebenen Blühfaktoren war die Transkriptakkumulation des *StFT* signifikant höher in transgenen als in Wildtyp Blättern. Die diurnalen Veränderungen des *StFT*-Transkriptgehalts wurden in allen untersuchten Pflanzen festgestellt, jedoch eine viel stärkere Oszillierung wurde bei den *StSUT4*-RNAi Pflanzen beobachtet. Am Anfang des Tages kam es zur *StFT*-Transkriptgehalt-Erhöhung in sowohl transgenen wie auch WT Pflanzen. Dieser Anstieg war jedoch in Blättern von *StSUT4*-RNAi-Pflanzen wesentlich stärker. Zu den anderen analysierten Zeitpunkten wurde auch die erhöhte *StFT*-Transkriptakkumulation in transgenen Pflanzen im Vergleich zum WT festgestellt, mit der Ausnahme der vom Tagesende und vom Anfang der Dunkelheit stammenden Proben.

## 4.20 Pfropfungsexperimente

Die in den mit dem *SUT4*-RNAi-Konstrukt unter konstitutivem 35S Promotor transformierten Pflanzen beobachteten phänotypischen Veränderungen betrafen hauptsächlich die *Sink*-Organe. Es wurde auch gezeigt, dass die Kohlenhydrat-Veränderungen nicht nur *Source*-Blätter, sondern auch Knollen und Apex der transgenen Pflanzen betreffen. Es wurde die Frage gestellt, ob die in *Sink*-Organen beobachtenden Effekte unabhängig von den in *Source*-Blättern aufgetretenen Veränderungen also direkt als Effekt der *SUT4*-Inhibition in diesen Organen entstehen? Und, wie kommt es zur Kommunikation zwischen diesen weit voneinander entfernten Pflanzenorganen? Verschiedene Pfropfvarianten zwischen transgenen und Wildtyp-Pflanzen sollten erklären helfen, ob und wie die in *StSUT4*-RNAi-*Source* entstehenden Effekte die physiologische Prozesse der *Sink*-Organe wie die Blühinduktion und/oder die Knollenherstellung beeinflussen können.

#### 4.20.1 Pfropfversuche zwischen *StSUT4*-RNAi und Wildtyp Désirée

Mit jungen *StSUT4*-RNAi und WT Désirée Pflanzen wurden jeweils reziproke Pfropfungen durchgeführt. Es wurden Pflanzen mit entweder einem transgenen Pfropfreis und einer WT-Unterlage (*StSUT4*RNAi//WT) oder einem WT Reis und einer transgenen Unterlage (WT//*StSUT4*RNAi) erzeugt. Als Kontrolle wurde Wildtyp Désirée auf Wildtyp Désirée (WT//WT) gepfropft. Das Pfropfen war am erfolgreichsten, wenn die Pfropfreisspitzen, bevor sie mit der Unterlage zusammengebunden wurden, mit 2,5 mM EDTA-Lösung behandelt wurden, was die Kallosebildung verhindern sollte. Um die Rolle der *Source*-Blättern für die Phänotypeneffekte genauer zu untersuchen, wurden die *Source*-Blätter von der Hälfte der durch Pfropfung erzeugten Pflanzen regelmäßig von der Pfropfunterlagen entfernt. Infolgedessen wurden insgesamt 6 Pfropfvarianten erzeugt (Abb. 46 B). Zwei Wochen nach der Pfropfung wurden die richtig zusammengewachsenen, gesund aussehenden Pflanzen (etwa 70% aller gepfropfter Pflanzen) zur weiteren Analysen selektiert.

Analyse des Blühbeginns und des Knollenertrags der unterschiedlichen Pfropfvarianten zeigte, dass die phänotypischen Effekte der *Sink*-Organen nicht nur von der Anwesenheit der *StSUT4*-RNAi Pflanzenorgane abhängig waren, sondern auch durch die Anwesenheit der Unterlage-Blätter beeinflusst wurden (Abb. 46).

Am frühesten kamen *StSUT4*RNAi//WT und WT//*StSUT4*RNAi Pflanzen zur Blüte, deren Unterlage Blätter besaßen (Abb. 46 A). Wenige Tage später erblühten die *StSUT4*RNAi//WT Pflanzen, an denen die Blätter der WT-Unterlagen regelmäßig entfernt wurden. Dieser Unterschied war signifikant (Abb. 46 A, durch unterschiedliche Balkenfarben bezeichnet). WT-Pflanzen, die auf transgenen Unterlagen (WT//*StSUT4*RNAi) mit entfernten Blättern gepfropft wurden, blühten zeitgleich mit WT//WT Kontrollpflanzen, die noch alle Blätter besaßen. Die Kontrollpflanzen ohne die unteren Blätter kamen signifikant später zur Blüte als alle andere untersuchten Pfropfvarianten.

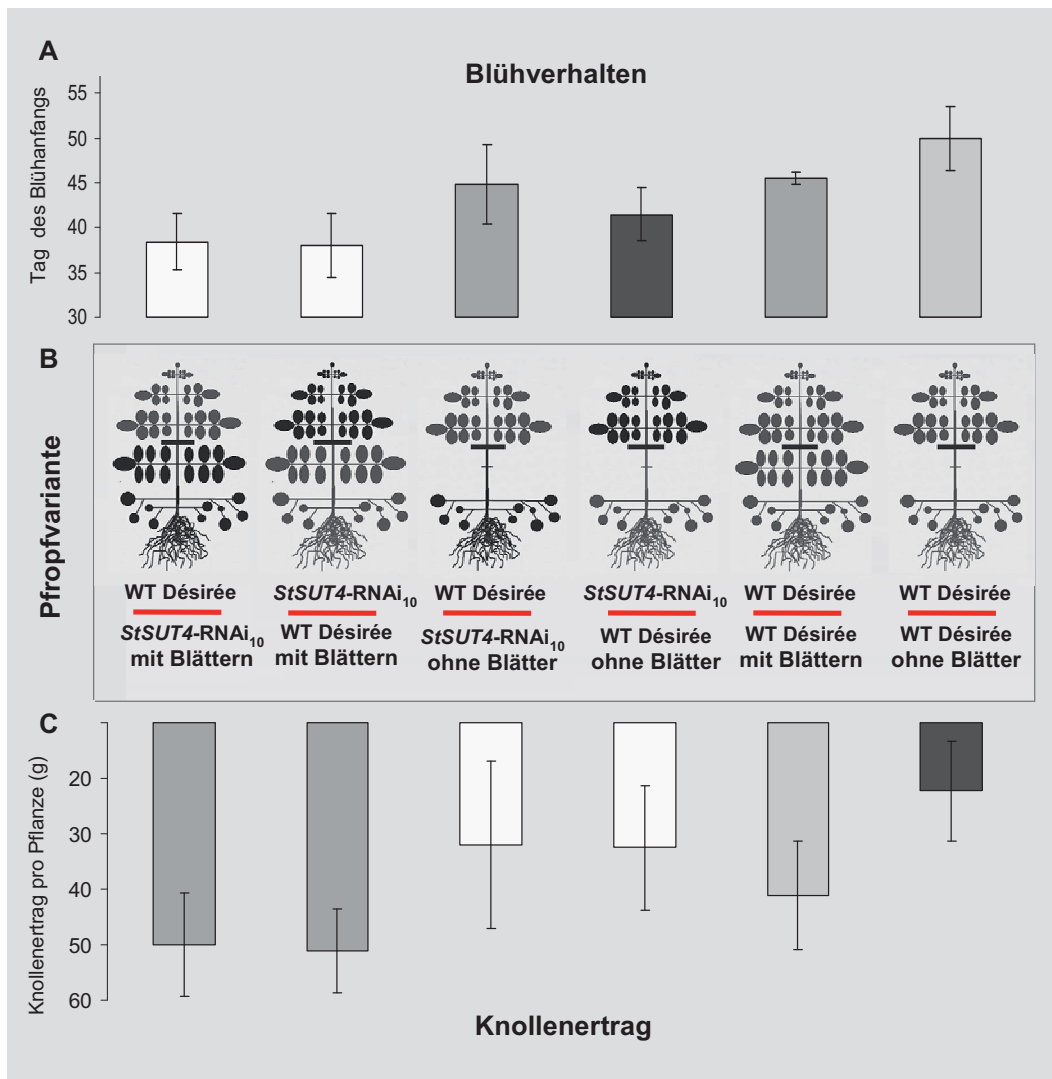


Abb. 46: Pfropfversuche zwischen *StSUT4*-RNAi und Wildtyp *Désirée*-Pflanzen. Das Experiment wurde im LT durchgeführt A. Analyse des Blühverhaltens B. Darstellung von Pfropfkombinationen C. Analyse der Knollenernte. Es wurden gemittelte Werte  $\pm$  SE ( $n \geq 3$ ) von einem repräsentativen Experiment dargestellt. Signifikante Veränderungen der Werte wurden durch unterschiedliche Balkenfarben gekennzeichnet. Die Ergebnisse wurden in 2 unabhängigen Experimenten bestätigt. Die signifikanten Veränderungen ( $p < 0,05$ ) zwischen transgenen und WT-Pflanzen wurden durch unterschiedliche Balkenfarben bezeichnet. Eine unterschiedliche Skalierung wurde angewendet.

Zwei Monate nach den Pfropfungen wurde der Ertrag der Knollen ausgewertet (Abb. 46 C). Den höchsten Knollenertrag pro Pflanze wiesen die Pfropfvarianten auf, die über alle Blätter verfügten. Dabei war das Knollengewicht von *StSUT4*RNAi//WT und WT//*StSUT4*RNAi mit unteren Blättern signifikant höher als das Knollengewicht von WT//WT Pflanzen, die untere Blätter besaßen (Abb. 46 C, durch unterschiedliche Balkenfarben bezeichnet). Die wesentliche Abnahme des gesamten Knollengewichts wurde nach dem Entfernen der unteren Blätter

(sogar über 50%) im Vergleich zu den entsprechenden, Blätter besitzenden Pfropfvarianten beobachtet. Die WT//WT Pflanzen ohne untere Blättern zeigten den kleinsten Ertrag von allen untersuchten Pfropfvarianten. Der Knollenertrag der StSUT4RNAi//WT und WT//StSUT4RNAi Pflanzen war dagegen vergleichbar.

#### **4.20.2 Pfropfversuche zwischen *StSUT4*-RNAi Désirée und Wildtyp Andigena**

Für die genauere Verifizierung der oben dargestellten Ergebnisse wurden die Désirée-WT-Pflanzen in einem neu geplanten Pfropfversuch durch WT-Andigena ersetzt. Im Gegensatz zu Désirée sind die Andigena-Wildtyp-Pflanzen im LT nicht zur Knollenbildung fähig (obligatorisch KT-abhängige Pflanzen) (Rodríguez-Falcón *et al.*, 2006).

Es ist nicht gelungen, die durch die Pfropfungen erzeugten Pflanzen zur Blüte zu bringen. Es war jedoch zu sehen, dass die *StSUT4*-RNAi-Désirée-Pflanzen, die auf Andigena-Wildtyp-Unterlagen (*StSUT4*-RNAi-Désirée//WT-Andigena) gepfropft wurden, diese zur Induktion der Knollenbildung unter LT-Bedingungen brachten (Abb. 47 A und B).

Ähnlich wie im Verlauf während der Pfropfversuche mit Désirée-WT-Pflanzen (Kap. 4.20.1), wurde auch in diesem Experiment beobachtet, dass die Abwesenheit von Unterlageblättern den Knollenertrag signifikant erniedrigte. Die Unterschiede zwischen den Knollenerträgen der einander entsprechenden Pfropfvarianten (mit und ohne Unterlageblättern) waren jedoch viel drastischer als in den Pfropfversuchen der Désirée-WT-Pflanzen. Die erzeugten Pflanzen, die Bestandteile von WT-Andigena enthielten und keine Unterlageblätter aufwiesen, stellten bis zum Zeitpunkt der Knollenernte oft gar keine Knollen her (Abb. 47 und 48).

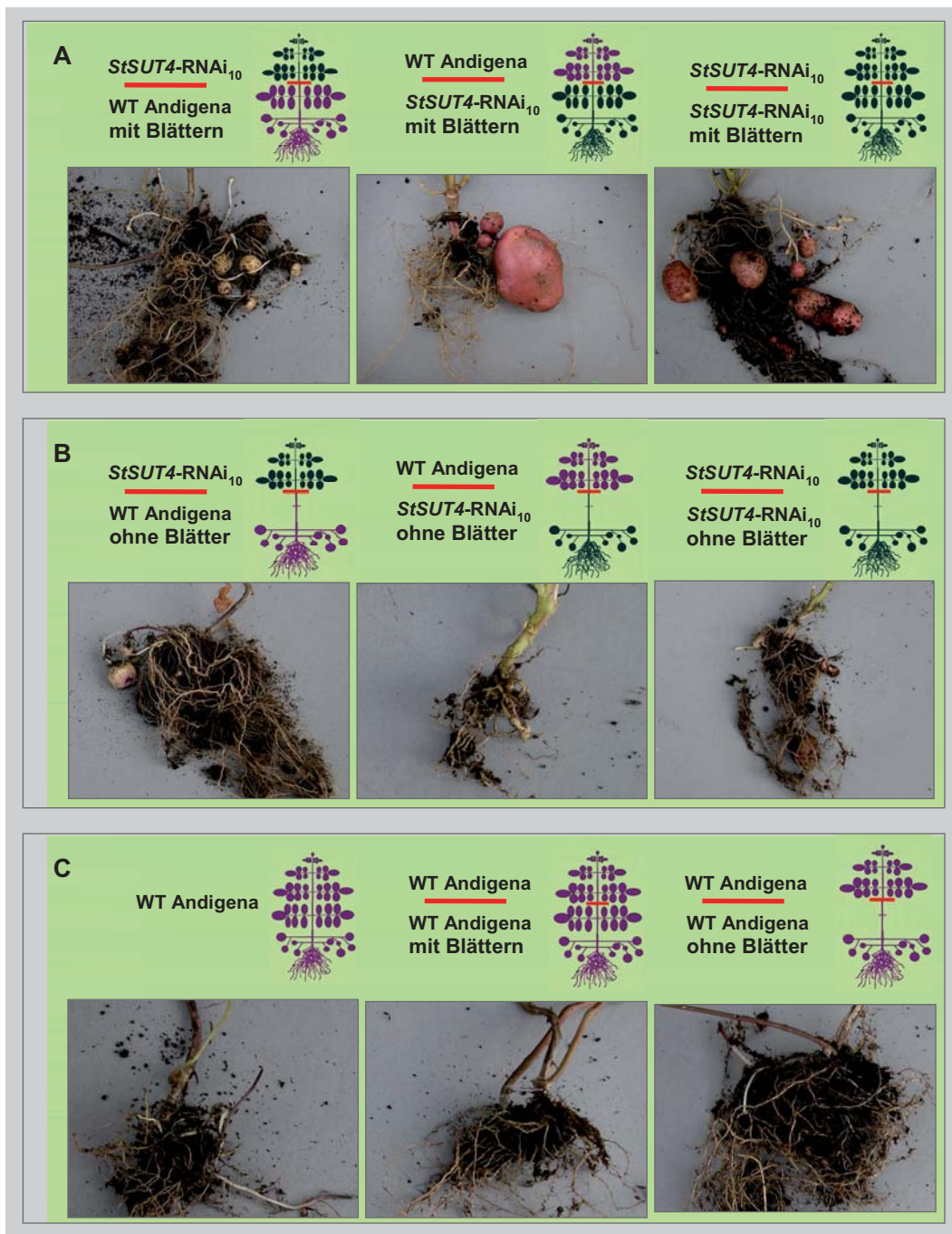


Abb. 47: Knollenbildung in verschiedenen Pfropfvarianten der *StSUT4-RNAi*-*Désirée*-Pflanzen und Andigena-Wildtyp-Pflanzen. Das Experiment wurde im LT durchgeführt A. Pfropfvarianten mit Unterlageblättern B. Pfropfvarianten ohne Unterlageblätter C. Andigena-Kontrollpflanzen. Es wurden gemittelte Werte  $\pm$  SE ( $n \geq 3$ ) von einem repräsentativen Experiment dargestellt. Die Ergebnisse wurden in 2 unabhängigen Experimenten bestätigt.

Als negative Kontrolle für dieses Experiment wurden ungepfropfte sowie auch Andigena-gepfropfte WT-Andigenapflanzen angewendet (Abb. 47 C). In diesen Kontrollpflanzen wurde

nie eine Knollenbildung im LT festgestellt. Sogar bei den Pflanzen, die für eine lange Zeit (4 und mehr Monate) unter LT-Bedingungen gelassen wurden, kam es nie zur Knollenherstellung.

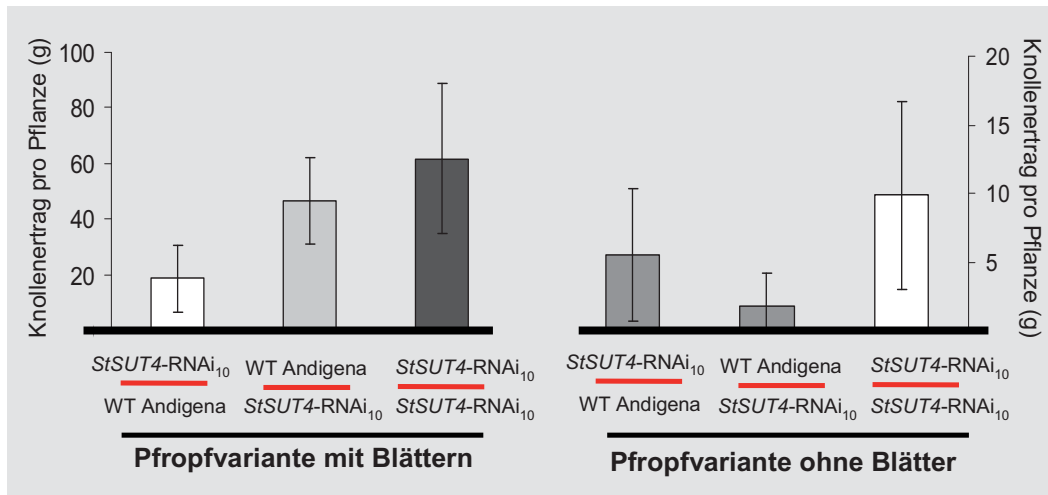


Abb. 48: Knollenernte der Pfropfvarianten, die aus *StSUT4*-RNAi und Andigena Wildtyp erzeugt wurden. Pflanzen wurden unter LT-Bedingungen angezogen. Es wurden gemittelte Werte  $\pm$  SD ( $n \geq 3$ ) von einem repräsentativen Experiment dargestellt. Die Ergebnisse wurden in 2 unabhängigen Experimenten bestätigt. Die signifikanten Veränderungen ( $p < 0,05$ ) zwischen den dargestellten Werten wurden durch unterschiedliche Balkenfarben bezeichnet.

Zur weiteren Kontrolle wurden die Wildtyp Désirée-Pflanzen auf den WT-Andigenapflanzen gepfropft. Es zeigte sich, dass die Wildtyp Désirée-Pflanzen zwar zur Induktion der Knollenherstellung in den Andigena-Unterlagen führten. Jedoch wurde es erst im dritten Monat nach der Pfropfung beobachtet. Während einer Knollenertragsanalyse, die 2 Monate nach der Pfropfung stattfand, zeigten die Pfropfvarianten zwischen WT Désirée und WT-Andigena-Unterlagen noch keine Knollen.

## 4.21 Inhibierung von *StSUT4* in *S. tuberosum* ssp. *andigena*

Um die Effekte der reduzierten *SUT4*-Expression auf Phänotyp und Funktion von *Sink*-Organen der streng photoperiodisch regulierten Andigena Kartoffelpflanzen genauer untersuchen zu können, wurde eine Transformation der Pflanzen mit dem *StSUT4*-RNAi Konstrukt vorgenommen.

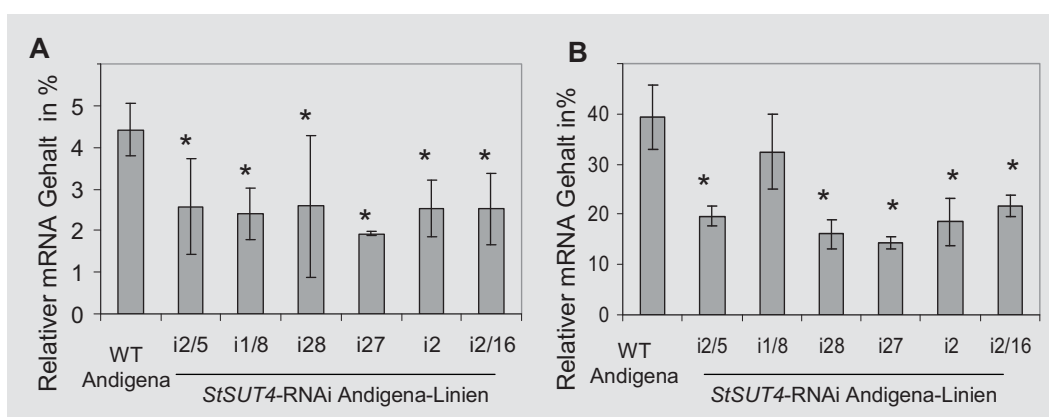


Abb. 49: Reduktion des *StSUT4*-mRNA in *StSUT4*-RNAi Andigena Gewebe im Vergleich zu den Kontroll-Wildtyp-Andigena A. *Source*-Blätter B. reife Blüten. Mittelwerte  $\pm$  SD von relativen mRNA-Gehalten in 3-5 Proben von jeweils mindestens 3 Pflanzen wurden dargestellt. Die Ergebnisse wurden in 3 unabhängigen Experimenten bestätigt. Die signifikanten Unterschiede zwischen transgenen und Wildtyp Pflanzen wurden als (\*) für  $p < 0,05$  bezeichnet. Eine unterschiedliche Skalierung wurde angewendet.

Über 100 Pflanzen wurden aus Kallusgewebe regeneriert. Die freundlicherweise von Frau Hongxia He durchgeführte PCR-Analyse von 40 Transformaten hat in allen der untersuchten Pflanzen das gewünschte Transgen gezeigt. Mittels qPCR wurde in den *Source*-Blättern und in den reifen Blüten von sechs unabhängigen transgenen Andigena-Linien eine signifikant reduzierte *SUT4*-Expression identifiziert (Abb. 49).

## 4.22 Phänotyp der *StSUT4*-RNAi Andigena-Pflanzen

### 4.22.1 Knollenherstellung unter LT-Bedingungen

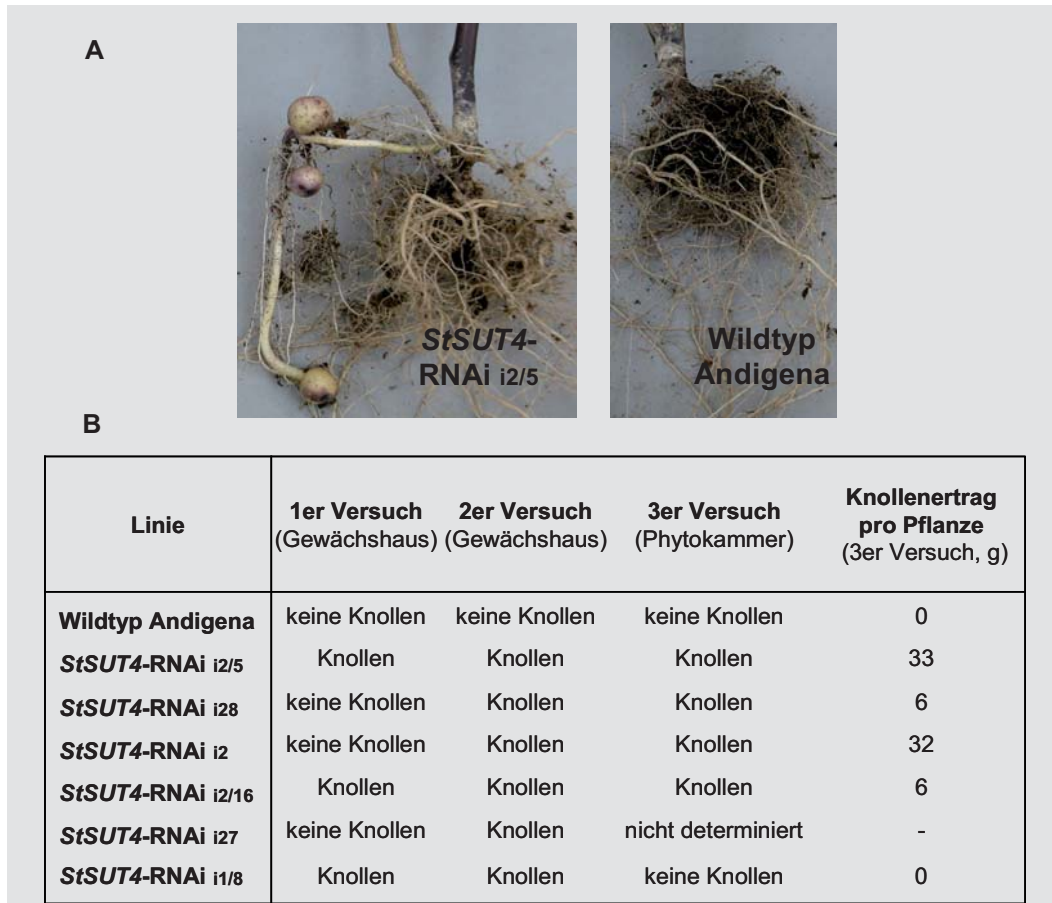


Abb. 50: Knollenherstellung von *StSUT4*-RNAi Andigena-Linien im LT A. Vergleich des Aussehens von unterirdischen Organen der *SUT4*-RNAi<sub>i2/5</sub> Andigena-Linien und der WT-Pflanzen. Im Gegensatz zum WT werden in der transgenen Andigena-Pflanze kleinen Knollen gebildet B. Analyse der Knollenproduktion. Ergebnisse von 3 repräsentativen unabhängigen Experimenten sind dargestellt; mindestens 2 Andigena-Pflanzen von jeder transgenen Linie und mindestens 3 WT Pflanzen wurden jeweils analysiert. Die Bezeichnung „Knollen“ heißt, dass im jeweiligen Versuch mindestens eine Pflanze der angegebenen Linie Knollen ausgebildet hat.

Die phänotypischen Effekte der *StSUT4*-RNAi-Transformation wurden unter LT-Bedingungen beobachtet. In 3 unabhängigen Experimenten konnte bei den transgenen Pflanzen, die unter LT-Bedingungen angezogen wurden, wiederholt und in unterschiedlichen Linien (meistens bei den Linien *SUT4*-RNAi<sub>i2/5</sub> und *SUT4*-RNAi<sub>i2/16</sub>) nach 2 Monaten Anzucht



eine Knollenbildung verzeichnet werden (Abb. 50 A und B). Bei WT-Andigenapflanzen wurde im LT dagegen niemals die Bildung von Knollen beobachtet, was auch im Rahmen des Pfropfungsexperiments bereits gezeigt wurde (Kap. 4.20.2 und Abb. 47 C).

#### 4.22.2 Pflanzenaussehen und Blühverhalten

Das Blühen der Andigena Pflanzen erfolgt nur unter bestimmten Lichtbedingungen. Essentiell für diesen Prozess erwies sich nicht nur die Bestrahlungsdauer (LD-Photoperiod) sondern auch die Lichtintensität (etwa 300  $\mu$ M Licht). Die deutlichsten phänotypischen Unterschiede zwischen den transgenen und Wildtyp Andigena Pflanzen wurden während der generativen Entwicklungsphase beobachtet. Die *StSUT4*-RNAi Andigena waren kleiner als der WT, was durch das retardierte Internodien-Wachstum verursacht wurde (Abb. 51).

Transgene Andigena-Pflanzen blühten auch signifikant früher als WT-Andigena (Abb. 52). Auch an den auf der Abbildung (52 B) nicht dargestellten Linien *StSUT4*-RNAi<sub>i1/8</sub> und *StSUT4*-RNAi<sub>i27</sub>, wurde ein sehr früher Blühbeginn im Vergleich zu den WT Pflanzen beobachtet, was jedoch wegen einer zu kleinen Probenanzahl statistisch nicht ausgewertet wurde.

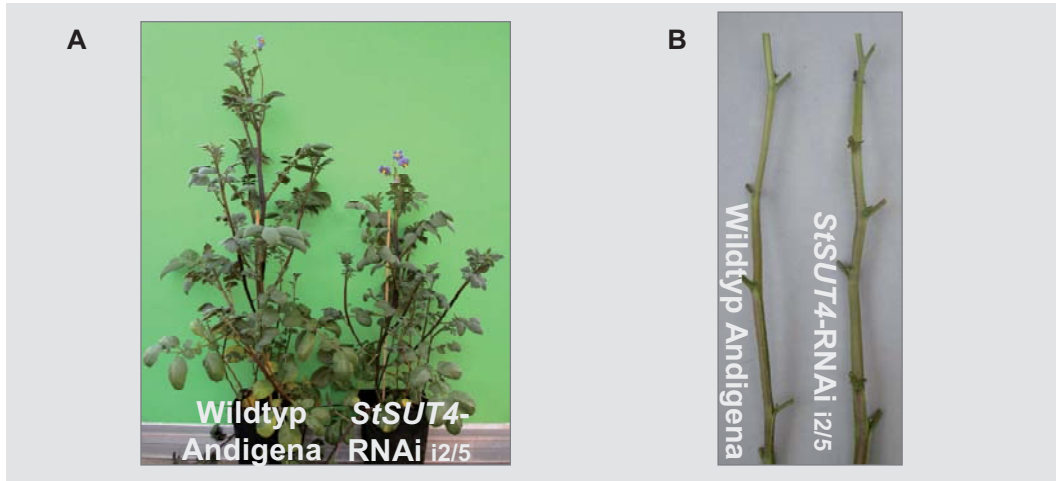


Abb. 51: Phänotyp der *SUT4*-RNAi<sub>i2/5</sub> Andigena Kartoffelpflanzen im Vergleich zum Wildtyp. A. Aussehen von 10 Wochen alten Pflanzen B. Obere Stängelsegmente mit unterschiedlich langen Internodien. Die Pflanzen wurden unter LT-Bedingungen angezogen.

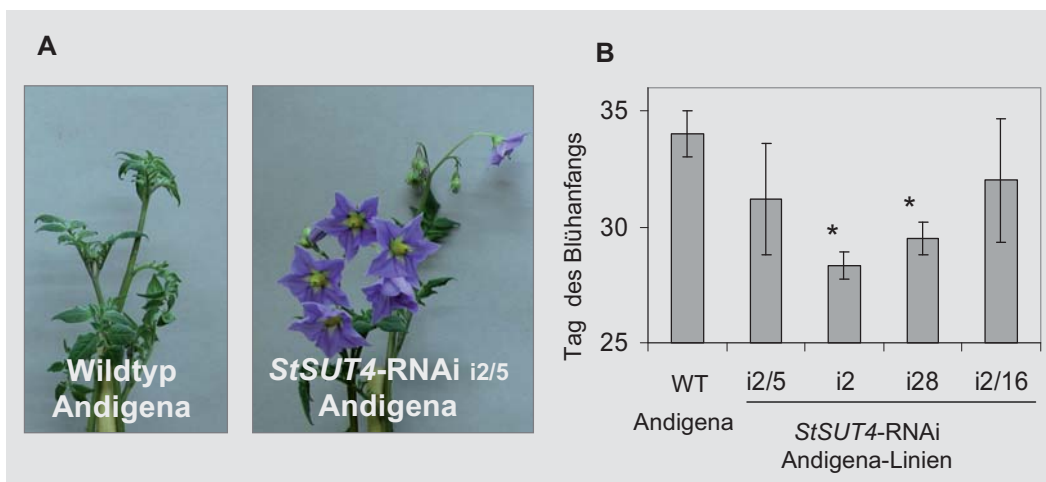


Abb. 52: Analyse des Blühverhaltens von Andigena Pflanzen A. Darstellung des Blütenstands von *SUT4*-RNAi<sub>i2/5</sub> Andigena 5 Tage nach Erblühen im Vergleich zu dem noch nicht blühenden Wildtyp B. Tag des Blühansfangs von transgenen Andigena im Vergleich zum WT. Es wurden gemittelte Werte  $\pm$  SD ( $n \geq 3$ ) von einem repräsentativen Experiment dargestellt. Die Ergebnisse wurden in 2 unabhängigen Experimenten bestätigt. Die signifikanten Unterschiede zwischen transgenen und Wildtyp Pflanzen wurden als (\*) für  $p < 0,05$  bezeichnet.

## 5 Diskussion

### 5.1 *SUT4*-Expressionsanalyse

Obwohl die Funktion der Mitgliedern der *SUT4* Saccharosetransporter-Familie bisher nur fragmentarisch geklärt wurde, kann man anhand der bekannten biochemischen und kinetischen Eigenschaften, sowie den Unterschieden im Expressionsprofil, in der Lokalisation und in den Regulationsmechanismen annehmen, dass *SUT4* eine andere Funktion im pflanzlichen Organismus als der gut charakterisierte *SUT1*-Saccharosetransporter erfüllt (Kühn, 2003; He *et al.* 2008).

#### 5.1.1 Quantitative *real time* PCR als Methode zur Analyse der Genexpression

Die Expression von *SUT4* ist im Gegensatz zu *SUT1* sehr schwach, was zur Folge hat, dass sowohl die *SUT4* mRNA wie auch das Protein durch Standardmethoden wie Western Blot oder Northern Blot kaum detektierbar sind (Weise *et al.*, 2000; persönliche Kommunikation mit Mitarbeitern von der AG von Christina Kühn). Für die Analyse der Genexpression schwach exprimierter Gene wie *SUT2* und *SUT4*, sowie von anderen Genen, deren Funktionen in den Pflanzen mit reduzierter *SUT4*-Expression vermutlich dereguliert werden, wurde die Methode der *real time* PCR (qPCR) gewählt. qPCR ermittelt die Genexpression auf Transkriptionsniveau (Ramakers *et al.*, 2003, Wong und Medrano, 2005). Die relative Quantifizierung (Vandesompele *et al.*, 2003), sowie die Analyse der Ergebnisse mittels LinReg-PCR-Software (Ramakers *et al.*, 2003), verhalfen zu einer hohen Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Die während der Arbeit festgestellten Expressionsprofile der untersuchten Gene stimmten mit den bekannten Literaturdaten überein, was die Zuverlässigkeit der qPCR-Methode belegt. Die Ergebnisse der *real time* PCR stimmen nicht nur mit qPCR-Literaturdaten, sondern auch mit den Daten überein, die mittels verschiedener anderer Methoden gewonnen wurden z.B. *SUT4*-Expressionsanalyse mittels RNase Protection Assay (RPA)

und Immunolokalisation (Weise *et al.*, 2000); *SUT1*-Expressionsanalysen mittels Immunoblot und Northern blot (Kühn *et al.*, 1997); oder *StCOL1* Expressionsanalysen mittels Northern blot (Martinez-Garcia *et al.*, 2002b).

### 5.1.2 *Sink*-spezifische *SUT4*-Expression

Die qPCR Analysen der *SUT4*-Transkriptakkumulation in verschiedenen Organen von Wildtyp Kartoffeln der Varietät Désirée (Abb. 1) sprechen für eine *Sink*-spezifische *SUT4*-Expression (Weise *et al.* 2000).

#### Entwicklungsabhängige *SUT4*-Expression in Vermehrungsorganen

In allen untersuchten Kartoffel-*Sink*-Organen war die *SUT4*-Transkriptakkumulation mindestens 3fach höher als in *Source*-Blättern. Der *SUT4*-Transkriptgehalt in *Sink* Blättern war etwa 6fach höher als in *Source*-Blättern, was einer entwicklungsabhängigen Regulation der *SUT4*-Expression suggeriert (Abb. 1). Die stärkste *StSUT4*-Expression wurde in Vermehrungsorganen, in Blüten und in Knollen festgestellt. In diesen Organen wurde auch eine Veränderung des *SUT4*-Expressionsniveaus im Laufe der Entwicklung beobachtet (Abb. 1). Die Blüten-spezifische *SUT4*-Expression wurde schon früher mit unterschiedlichen Methoden in *Arabidopsis* und in Tomaten festgestellt, hingegen war in *L. japonicus*-Pflanzen in Blättern, Blüten oder Stängel keine *LjSUT4*-Expression detektierbar (Weise *et al.*, 2000; Flemetakis *et al.*, 2003).

Die Aktivitätsanalyse des *AtSUT4*-Promotors wies auf eine starke *AtSUT4*-Expression in *Arabidopsis*-Blüten, insbesondere in Antheren (Weise *et al.*, 2000). Wie mittels RPA und qPCR-Methoden festgestellt wurde, ist die starke *SUT4*-Expression auch für Tomaten-Blüten charakteristisch, jedoch wurde die höchste *SUT4*-Akkumulation nicht in Antheren, sondern in weiblichen Blütenorganen und später in Tomatenfrüchten beobachtet. Die *SUT4*-Expressionstärke veränderte sich im Laufe der Tomatenfruchtentwicklung und war am stärks-

ten in grünen und schwächer in reifen roten Früchten, was die entwicklungsabhängige Regulation der *SUT4*-Expression suggeriert (Weise *et al.*, 2000, Hackel *et al.*, 2006).

Auf eine entwicklungsabhängige *SUT4*-Expression wiesen auch Analysen in Kartoffelfrüchten, die jedoch in Ermangelung ausreichender Mengen Pflanzenmaterials statistisch nicht ausgewertet wurden (Daten nicht präsentiert). Es ist aber gelungen, mittels der qPCR-Methode die entwicklungsabhängige Änderungen der *SUT4*-mRNA-Akkumulation in Knollen zu zeigen (Abb. 1), (Jackson, 1999; Fernie und Willmitzer, 2001; Rodríguez-Falcón *et al.*, 2006). Die qPCR-Ergebnisse zeigten, dass die *SUT4*-Transkriptakkumulation während der frühen Stadien der Knollenentwicklung stark ansteigt (Abb. 1). Die in 1cmØ Knollen beobachtete Verminderung der *SUT4*-Expression ist ein Mittelwert, der für die ganze Knolle festgestellt wurde. Jedoch ist das Knollengewebe nicht homogen, und wie die Analysen von 3cmØ Knollen gezeigt haben, war die *SUT4*-Expression in der Knolle nicht gleichmäßig (Abb. 1). Die stärkste *SUT4*-Expression in den 3cmØ Knollen wurde in den Proben beobachtet, die von perimedullaren Region stammen, während die Proben der Cortex-Region eine niedrigere *SUT4*-Transkriptakkumulation aufwiesen. Die Veränderungen des *SUT4*-Gehalts während der Knollenentwicklung scheinen mit dem Umschalten vom apoplastischen und auf den symplastischen Phloementladungsmechanismus, sowie mit der parallel dazu ansteigenden Su-Sy-Aktivität und sinkenden Invertaseaktivität korreliert zu sein (Rodríguez-Falcón *et al.*, 2006).

Während der Entwicklung eines *Sink*-Organs verändert sich auch dessen *Sink*-Stärke (Kuiper, 1993). Die Veränderungen der *SUT4*-mRNA-Akkumulation in Knollen, die auf variierende *SUT4*-Aktivität hinweisen, können mit einer veränderten *Sink*-Stärke der Knolle während der Entwicklung zu tun haben. Diese Theorie ist umso wahrscheinlicher, da in WT-Tomatenwurzeln, deren *Sink*-Stärke durch die Mykorrhizierung mit dem Pilz *Glomus mossae* erhöht wurde, eine Expressionssteigerung der Saccharosetransporter *SISUT1* und *SISUT4* gezeigt wurde, wohingegen die *SISUT2*-Expression in diesen mykorrhizierten Wurzeln reduziert war (Boldt *et al.*, Publikation in Vorbereitung). Der Einfluss der Mykorrhizierung auf die Saccharosetransporter-Expression deutet sowohl auf ihre Funktion im Wurzelbereich hin, als auch auf die wichtige Rolle des Saccharosetransports für die Ausbildung einer Symbiose mit Mikroorganismen. Eine solche Funktion wurde bereits für den *SUT4*-orthologen Transporter aus

*Lotus japonicus* *LjSUT4* postuliert, der eine starke Expression in Wurzeln und Wurzelknöllchen zeigt und vermutlich eine Funktion im Saccharosemetabolismus während der Knöllchen-Entwicklung erfüllt (Flemetakis *et al.*, 2003).

#### *SUT4*-Transkriptgehalt im Stängel

Ein relativ hoher *StSUT4*-Transkriptgehalt wurde in den oberirdischen Stängelsegmenten sowie im Stolon festgestellt (Abb. 1). Der Befund kann entweder auf eine starke *SUT4*-Expression im Stängelgewebe hinweisen, oder aber darauf beruhen, dass *StSUT4* Transkripte im analysierten Stängel-Material aus benachbarten Organen über den Phloemtranslokationsstrom transportiert werden.

Die Literatur-Daten postulieren Phloem-Mobilität von *SUT1*-Transkripten sowie des *SUT1*-Proteins (Kühn *et al.*, 1997; He *et al.*, 2008). Während die *SUT1*-Transkripte sowohl in Siebelementen als auch in den benachbarten Geleitzellen detektiert wurden, wurde das *SUT1* Protein aus *Solanaceae* mithilfe spezifischer affinitätsgereinigter Antiseren nur in den Siebelementen des Phloems nachgewiesen (Kühn *et al.*, 1997, Barker *et al.*, 2000, Weise *et al.*, 2000, Reinders *et al.*, 2002). Außerdem wurden die *SUT1*-Transkripte im Phloemsaft von verschiedenen Pflanzen gefunden (Doering-Saad *et al.*, 2002; Knop *et al.*, 2001). Die von He *et al.*, 2008 durchgeführten Untersuchungen weisen auf einen Langstrecken-Transport von *SUT1*-Transkripten zwischen 2 durch Pfropfung verbundene Solanaceen-Pflanzen, sowie zwischen einer Solanaceen-Wirtspflanze und dem Holoparasit *Cuscuta reflexa* hin (He *et al.*, 2008).

Sowohl *StSUT4* aus Kartoffel als auch *SISUT4* aus Tomate wurde ebenso wie *SUT1* in Siebelementen des Phloems, unter anderem entlang des Transportphloems der Petiolen und des Stängels immunlokalisiert (Weise *et al.*, 2000, Reinders *et al.*, 2002). Da die Siebelemente transkriptionsunfähig sind und keinen Zellkern besitzen, wurde, wie im Fall von *SUT1*, der Import von entweder *SUT4*-Transkripten oder des Proteins von benachbarten Zellen vorausgesetzt (Weise *et al.*, 2000). Eine Phloem-Mobilität der *SUT4*-Transkripte oder/und des Proteins wird ebenfalls in Betracht gezogen.

In Hinsicht auf die potentielle *SUT4*-Phloem-Mobilität scheint die Theorie interessant zu sein, dass der in *Sink*-Organen beobachtende Anstieg des *SUT4*-mRNA-Gehalts nicht infolge einer verstärkten *SUT4*-Expression in *Sink*-Geweben entsteht, sondern durch die Akkumulation der aus *Source*-Organen importierten *SUT4*-Transkripte generiert wird. Für die Prüfung dieser Theorie könnten zukünftig modifizierte Pflanzen mit einer *Sink*-spezifisch reduzierten *SUT4*-Expression, z. B. mit Hilfe des Kartoffelknollen- bzw. Tomatenfrucht-spezifischen Patatin-Promoters B33, (Kühn *et al.*, 2003; persönliche Kommunikation mit C. Kühn), hilfreich werden.

### **5.1.3 Akkumulation der *SUT*-Transkripte verändert sich im Laufe des Tages**

Ein großer Teil von Genen, die am Zucker-Metabolismus, also an der Produktion, Transport und Speicherung von Zuckern beteiligt sind, werden circadian reguliert, was aus der Anpassung der Pflanzen an den Tagesrhythmus der Photosynthese-Aktivität und der dadurch verursachten diurnalen Änderungen der Zucker-Konzentration folgt (Harmer *et al.*, 2000). Bekannt ist auch, dass mehrere Zucker-induzierte Gene durch die innere Uhr reguliert werden (Bläsing *et al.*, 2005).

Früher wurde durch die Analyse der Halbwertszeit der *SUT1* mRNA und des Proteins in Solanaceen-Blättern gezeigt, dass das Expressionsmuster des Saccharosetransporters SUT1 einer diurnalen Rhythmik folgt (Kühn *et al.*, 1997). Die mittels qPCR durchgeführten Analysen zeigen, dass nicht nur SUT1, sondern auch die Gene *SUT2* und *SUT4* in Kartoffel-*Source*-Blättern im LT einer diurnalen Regulation unterliegen (Abb. 2). Alle untersuchten *SUT*-Transkripte zeigten sogar im Dauerlicht die Tendenz zur Oszillation (Abb. 2), was auf einen circadianen Regulationsmechanismus der *SUT*-Expression hinweist. Die durchgeführten Untersuchungen weisen auf diurnale Transkriptionsregulation von *SUT*-Genen auch unter KT Bedingungen hin (unpublizierte eigene Daten, persönliche Kommunikation mit den Mitarbeitern der AG Kühn).

Es wurde früher eine lichtabhängige diurnale Oszillierung der *SUT1*-Transkriptakkumulation postuliert (Kühn *et al.*, 1997). Aus den im Dauerdunkel und im Dauerlicht durchgeführten Beobachtungen kann man eine lichtstabilisierte Transkriptakkumulation schlussfolgern. Die lichtabhängige Transkriptstabilisierung scheint besonders deutlich im Fall von *SUT4*, dessen Transkript-Akkumulation im Dauerlicht verstärkt war (Abb. 2). Im Dauerdunkeln verschwinden *SUT4* sowie *SUT2* Transkripte schnell und *SUT1*-Transkripte waren nur kurzzeitig mit qPCR detektierbar (Kap. 4.1.4., ungezeigte Daten). Von anderer Seite wurde eine durch ein verringertes HR:DR Verhältnis verursachte Stabilisierung der *SUT4* Transkripte im Schatten beobachtet, was auf Beteiligung von Phytochromen an der *SUT4*-Expression hinweisen kann (Abb. 31).

Variabilität von Lichtbedingungen verursacht verschiedene metabolische Veränderungen, vor allem Änderungen im Zuckerstatus in den pflanzlichen Organen. Wie es mittels *Global Expression Profiling* gezeigt wurde, gehören Zucker zusammen mit der inneren Uhr zum Haupt-Input des diurnalen Expressionsrhythmus für die Mehrheit diurnal regulierter Genen in *Arabidopsis* (Bläsing *et al.*, 2005). Beide Regulationsmöglichkeiten werden als Input zur Generierung einer diurnalen *SUT*-Expression für möglich gehalten.

Besonders deutliche Oszillation im Dauerlicht zeigte *SUT1* (Abb. 2). Essentiell für den *SUT1*-Expressionsrhythmus scheinen die Promotorstruktur und transkriptionale Regulationsmechanismen zu sein (He *et al.*, 2008). Im *SISUT1*-Promotor wurde ein *cis*-Element lokalisiert, dessen Sequenz Ähnlichkeit zum EE-Element (*evening element*) aufweist. Das EE-Element ist potentiell für die Regulation vieler circadianer Gene, z.B. TOC1, ELF4 und GI verantwortlich (Harmer *et al.*, 2000, Alabadi *et al.*, 2001; Harmer und Kay, 2005; Mizoguchi *et al.*, 2005; He *et al.*, 2008). Auf die Bedeutung des Promotors für die *SUT1*-Expressionregulation weisen die bei den transgenen Kartoffelpflanzen mit heterologischer *SUT1*-Überexpression (35S::*SoSUT1*) beobachtenden Störungen des diurnalen *SUT1*-Expressionsrhythmus hin (Leggewie *et al.*, 2003, He *et al.*, 2008). Im Gegensatz zum *SUT1* wurde aufgrund der Studien zur Transkript-Stabilität eine post-transkriptional-regulierte *StSUT2/StSUT4* Expression angenommen, an der kurzlebige, über den 26S Proteasomweg abgebaute Repressorproteine teilnehmen (He *et al.*, 2008).



Die maximale mRNA-Akkumulation von *SUT1* und *SUT4* wurde zur Mitte des Tages beobachtet, was mit dem Tagesprofil der Konzentrationen löslicher Zucker in WT-*Source*-Blättern (maximale Konzentration in der Mitte des Tages) korreliert (Abb. 2, Abb. 11; Urbańczyk-Wochniak *et al.* 2005). Obwohl die unter Verwendung des Web Signal Scan Programms durchgeführte Analyse der *SISUT1*-Promotorsequenz die Anwesenheit von Promotor-Sequenzmotiven, die für Zucker-Repression verantwortlich sind, zeigte, wurden es bisher keine Saccharose- sowie Glukose-Effekte auf die *SUT1* und *SUT4* Expression in Tomaten und Kartoffeln beobachtet (Harms *et al.* 1994; Barker *et al.*, 2000; He *et al.*, 2008; nicht gezeigte Daten). (Analysiert wurde ein 5500 bp langes genomisches Fragment von *SISUT1*, einschliesslich aller Intronsequenzen, sowie 1730 bp upstream vom ATG). Dagegen wurde eine starke Saccharose-Induzierbarkeit der *SUT2*-Expression festgestellt (Barker *et al.* 2000). Die maximale *SUT2*-Transkriptakkumulation in Kartoffelblättern wurde jedoch am Anfang des Tages beobachtet, und im Gegensatz zur *SUT1*- und *SUT4*-Transkription war sie nicht mit der im Laufe des LT-Tages diurnal steigenden Saccharosekonzentration korreliert (Abb. 2, Abb. 11). Dennoch ist es möglich, dass Zucker als Modulator der diurnalen *SUT*-Expression wirkt. Auf solche komplexe Regulation der diurnalen Expression vieler am Zuckermetabolismus beteiligten Gene weisen die in *Arabidopsis* durchgeführten Analysen (Bläsing *et al.* 2005).

Ein diurnaler Expressionsrhythmus von *SUT*-Genen wurde nicht nur in *Source*-Blättern, den Organe, in denen die Perzeption von Photoperiode und Lichtqualität erfolgt, sondern auch in *Sink*-Organen wie z.B. in Blüten beobachtet (für *SUT4* Abb. 5; für *SUT2* und *SUT1* nicht gezeigt). Für *SUT4* war nicht nur eine erhöhte Transkriptakkumulation, sondern auch eine Phasenverschiebung des Expressionsrhythmus in Blüten im Vergleich zu den *Source*-Blättern zu beobachten. In Blüten wurde die maximale *SUT4*-Transkriptakkumulation nämlich anders als in Blättern in der Mitte der Dunkelperiode beobachtet.

## 5.2 Inhibition der *SUT4*-Expression mittels RNA Interferenz

Obwohl die Anwendung der antisense-Technik sich erfolgreich für die Herstellung von transgenen Pflanzen mit reduzierter *SUT1*-Expression (Riesmeier *et al.*, 1994; Kühn *et al.*, 1996; Bürkle *et al.*, 1998; Hackel *et al.*, 2006) sowie mit reduzierter *SUT2*-Expression (Hackel *et al.* 2006) zeigte, ist eine Inhibierung des *SUT4* mittels derselbe Methode nicht gelungen (Frommer und Kühn, ungezeigte Daten).

Während der vorliegenden Arbeit wurden zum ersten Mal transgene Pflanzen, die konstant reduzierte *SUT4*-Expression zeigen, erstellt. Dies ist dank der RNA Interferenz-Technik, die auf dem PTGS-Phänomen (*posttranscriptional gene silencing*) beruht, gelungen (Abb. 4 A und B; Abb. 49 A und B). Die Reduktion der *SUT4*-Expression in transgenen Pflanzen war hoch spezifisch, was durch qPCR Expressionsanalysen von *SUT1* und *SUT2* bestätigt wurde. Die *SUT2*-mRNA-Akkumulation in den Blättern von *StSUT4*-RNAi-Kartoffeln war im Vergleich zum WT unverändert (Abb. 6), was die unspezifische Inhibition des *SUT2* infolge der Transformation mit dem *StSUT4*-RNAi-Konstrukt ausschließt. Im Fall von *SUT1* wurde zwar zur Mitte des Tages eine tendenziell reduzierte Expression beobachtet, die jedoch nicht signifikant war (Abb. 6). Diese Reduktion der *SUT1*-Expression könnte zwar auf einen schwachen unspezifischen Effekt des *StSUT4*-RNAi-Konstruktes hinweisen, der Phänotyp der transgenen Pflanzen deutet jedoch eher auf eine verstärkte *SUT1*-Aktivität hin (Kap. 5.4.2).

## 5.3 Folgen der *StSUT4*-Inhibierung

Inhibition der *StSUT4*-Expression hatte in Kartoffelpflanzen einen deutlicheren Effekt als in Tomatenpflanzen, deswegen konzentrierten sich die detaillierten Analysen vor allem auf die transgenen Kartoffelpflanzen.

### 5.3.1 Inhibierung des *StSUT4* führt in Kartoffeln zu Veränderungen im Wachstum, Blühverhalten und in der Knollenherstellung

Effekte nach Transformation mit dem *StSUT4*-RNAi Konstrukt in Désirée Kartoffelpflanzen sowie in Andigena Kartoffeln waren am deutlichsten unter LT-Bedingungen zu erkennen. Der Phänotyp der *StSUT4*-RNAi Kartoffeln der Varietät Désirée (Kap. 4.5), die im Vergleich zum WT kleineren Wuchs (Abb. 7) und verkürzte Internodien (Abb. 8 D) zeigten, und zudem früher blühten (Abb. 9 C D E) und sich durch einen erhöhten Knollenertrag (Abb. 10 A) auszeichneten, wurden in transgenen *StSUT4*-RNAi Andigena Kartoffeln noch intensiviert (Kap. 4.22). Verstärkung des Effekts der Transformation mit dem *StSUT4*-RNAi Konstrukt könnte bei den Andigena Pflanzen darauf beruhen, dass sie hinsichtlich der Knollenproduktion obligate KT-Pflanzen darstellen. Die für die Transformation vergewendeten WT-Andigena-Pflanzen waren nur unter LT-Bedingungen zum Blühen und nur im KT zur Knollenbildung fähig (Abb. 50), was mit Literaturdaten übereinstimmt (Macháčková *et al.*, 1998; Jackson, 1999; Martínez-García *et al.*, 2002b; Rodríguez-Falcón *et al.*, 2006). Auch die Kartoffeln der Varietät Désirée zeigen ein streng LT-abhängiges Blühverhalten, während die Knollenbildung bei den Pflanzen nur fakultativ KT-abhängig ist (Schittenhelm *et al.*, 2004). Unter LT-Bedingungen kommt es bei den WT Désirée Kartoffeln später zur Knollenbildung als im KT. Die Transformation mit dem *StSUT4*-RNAi Konstrukt verursachte bei Désirée einen erhöhten Knollenertrag im LT, was auf eine frühzeitige Induktion der Knollenbildung im LT beruht (Abb. 10 D) und zudem mit einem erhöhten Stärkegehalt einhergeht, der positiv mit dem Knollengewicht korreliert ist (Leggewie, 1996; Abb. 10 C; Abb. 15; Abb. 18). Das trifft jedoch nicht für eine erhöhte Knollenanzahl zu (Abb. 10 B). Die Reduktion der *SUT4*-Expression bei den absolut KT-abhängigen Andigena Linien führte zur Knollenbildung sogar unter nicht-induktiven LT-Bedingungen (Abb. 50).

Allgemein kann man zusammenfassen, dass in *StSUT4*-RNAi Kartoffeln drei verschiedenen physiologische Prozesse deutlich betroffen sind: die Stängel elongation, die Blühinduktion und die Knolleninduktion und -entwicklung (Kap. 4.5; Kap. 4.22). Alle drei Prozesse unterliegen in Pflanzen einer komplexen Regulation, an der unter anderem Hormone, Photorezeptoren, sowie Komponenten der inneren Uhr beteiligt sind (Jackson und Prat 1996; Martínez-García *et al.* 2002a; Devlin *et al.* 2003; Salter *et al.*, 2003; Vandenbussche *et al.* 2005; Lough und Lucas 2006; Rodríguez-Falcón *et al.*, 2006; Djakovic-Petrovic *et al.*, 2007). Bekannt ist auch

die regulatorische Rolle von Zuckern, insbesondere Saccharose, als potentes blühinduktives Signalmolekül. Bekannt ist auch die positive Rolle der Saccharose für die Induktion der Knollenbildung, sowie der Modifizierung von Wachstumsprozessen unterschiedlicher pflanzlicher Organe. Die bekannten Literaturdaten, die unter anderem auf Untersuchungen von bekannten Mutanten der Saccharose-Signaltransduktion, sowie von transgenen Pflanzen mit einem veränderten Zucker-Metabolismus basieren, bestätigen, dass Saccharose sowohl phytohormonelle Stimuli (unter anderem die GA- und die Ethylen-gesteuerten Signalwege), als auch den photoperiodisch gesteuerten Signaltransduktionsweg modifizieren kann. (Rideout *et al.*, 1992; Corbesier *et al.*, 1998; Xu *et al.* 1998a; Jackson, 1999; Gibson *et al.*, 2001; Achard *et al.*, 2003; Gibson, 2004; Bernier und Périlleux, 2005; Kozuka *et al.*, 2005; Lough und Lucas 2006; Rodríguez-Falcón *et al.*, 2006; Eriksson *et al.*, 2006; Dijkwel *et al.* 2007; Kap. 1.5.4).

Die durchgeführte Analyse der verschiedenen Aspekte der *StSUT4* Inhibition, zu der auch die Untersuchung des veränderten Kohlenhydratgehaltes in verschiedenen Organen und in den Phloemexudaten gehört, deuten darauf hin, dass es in den Kartoffeln als Folge einer reduzierten *SUT4*-Expression möglicherweise zu einer Deregulation einer gemeinsamen regulatorischen Integrationsstelle dieser unterschiedlichen physiologischen Prozesse kommt. Eine potentielle regulatorische Rolle des SUT4 für die Steuerung der Stängel elongation, der Blühinduktion, sowie der Knollenproduktion wird daher angenommen

### **5.3.2 Änderungen der Fruchtentwicklung in *SISUT4*-Tomaten**

*Solanum lycopersicon* gilt als Modellpflanze für die autonome Blühinduktion (Dielen *et al.*, 2001). Bei der autonomen Blühinduktion spielen endogene Faktoren wie die Pflanzengröße und/oder die Anzahl der Blätter sowie das Alter der Pflanze eine kritische Rolle (Bernier und Périlleux, 2005). Die autonome Blühinduktion ist strikt von der Kondition der vegetativen Organe der Pflanze abhängig (Bernier und Périlleux, 2005). In Tomaten kommt es sehr früh während der Entwicklung zur Blühinduktion, wenn die Pflanzen eine kritische Anzahl an Blättern erreichen (Dielen *et al.*, 2001). Wie unter anderem bei *Arabidopsis* gezeigt wurde, können die Gene des autonomen Blühinduktionswegs nicht nur Änderungen des Blühverhaltens, sondern auch pleiotrope Effekte auf die vegetative Pflanzenentwicklung verursachen

(z.B. Soppe *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2006). Im Gegensatz zu den Kartoffeln kam es bei den transgenen *StSUT4*-RNAi Tomaten weder zu Veränderungen des vegetativen Phänotyps, noch zur Beschleunigung der Blühinduktion (Kap. 4.11), was darauf hindeutet, dass die autonomen Gene von *SUT4* unabhängig reguliert werden. Außerdem weist dies auf die wichtige Rolle der Photoperiode bei der Entstehung der in *StSUT4*-RNAi Kartoffeln beobachteten Effekte hin.

Charakteristisch für die *StSUT4*-RNAi Tomaten war frühzeitiges Reifen der Früchte und ein veränderter Fruchtphänotyp mit reduzierter Samenproduktion (Abb. 19, Abb. 20, Abb. 21). Eine verminderte Fertilität der Früchte wurde bereits nach Inhibierung der Expression des Saccharosetransporters *SISUT2* in *SISUT2* Antisense-Tomaten beobachtet (Hackel *et al.*, 2006). Sowohl in *SISUT2*-, als auch in *SISUT1*-Antisense Tomaten kam es zu einem verringerten Fruchtertrag.

*SISUT1*-Antisense-Tomaten zeigten zudem Störungen in der Phloembeladung und im Langstreckentransport von Saccharose, wodurch eine verminderte Ausbildung von *Sink* Organen wie z.B. Tomatenfrüchten erklärt werden kann (Riesmeier *et al.*, 1994; Kühn *et al.*, 1996; Bürkle *et al.*, 1998; Hackel *et al.*, 2006). Dagegen zeigen die *SISUT4*-RNAi Tomaten keine Veränderungen der vegetativen Entwicklung oder des Phloemeffluxes, die auf eine reduzierte *SUT1*-Aktivität hindeuten könnten (Kap. 4.11, nicht gezeigte Daten). Man kann daher ausschliessen, dass es sich in den *SISUT4*-RNAi Pflanzen und den *SISUT1*-Antisense-Pflanzen um den gleichen Mechanismus handelt, der zu einer Verringerung des Fruchtertrages führt.

Bei den *SUT2* Antisense-Tomaten dagegen waren ähnlich wie bei den *StSUT4*-RNAi Tomaten ausschliesslich die Früchte betroffen (Hackel *et al.*, 2006; Abb. 19; Abb. 21). In beiden Fällen war die Verringerung des Ertrags eher durch die Reduktion der Fruchtgröße, als die Fruchtanzahl verursacht (Hackel *et al.*, 2006; Abb. 20 A und B). Es wurde postuliert, dass *SISUT2* an den Prozessen der Pollenentwicklung und -Keimung teilnimmt und die Inhibition der *SUT2*-Expression in den *SUT2* Antisense-Tomaten Veränderungen hinsichtlich Frucht-morphologie und Samenproduktion verursacht (Hackel *et al.*, 2006). Diese Theorie kann je-

doch aufgrund eines unterschiedlichen Expressionsmusters von *SISUT2* und *SISUT4* keine Erklärung der veränderten Tomatenfruchtentwicklung der *StSUT4*-RNAi Tomaten darstellen. Die *SISUT2*-Expression wurde in männlichen Blütenstrukturen festgestellt und steigt während der Tomatenfruchtentwicklung an (Hackel *et al.*, 2006). Die *SISUT4*-Expression ist dagegen für Ovarien und für grüne Früchten spezifisch und sinkt während der Früchteentwicklung (Weise *et al.*, 2000; Hackel *et al.*, 2006). Diese Befunde suggerieren, dass die reduzierte Samenproduktion und modifizierter Fruchtphänotyp der *StSUT4*-RNAi Tomaten eher durch eine Störung der Funktion weiblicher Blütenorgane oder/und durch eine Störung der frühen Stadien der Fruchtentwicklung verursacht wird.

In den Antisense *SISUT2*-Früchten wurde eine reduzierte Konzentration löslicher Zucker, (Glukose, Fruktose und Saccharose) festgestellt. Zudem wurde nachgewiesen, dass Pollenkeimung und Pollenschlauchwachstums durch Störungen des Saccharosetransports beeinträchtigt werden können. Anhand dieser Beobachtungen wurde postuliert, dass die bei den Antisense *SUT2*-Tomaten beobachteten Effekte infolge verminderter SUT2 Transportfunktion entstehen (Hackel *et al.* 2006). Die Effekte der Transformation mit *SUT4*-RNAi-Konstrukten weisen jedoch weder bei den Tomaten, noch bei den Kartoffeln auf eine Inhibierung des Saccharosetransports hin. Es wurde auch keine signifikanten Veränderungen der Pollenkeimungsrate sowie des Pollenschlauchwachstums in den *StSUT4*-RNAi Pflanzen nachgewiesen (persönliche Kommunikation mit Hongxia He). Die bei den *StSUT4*-RNAi Kartoffeln beobachteten Veränderungen des Kohlenhydratprofils sowohl in *Source*-Blättern wie auch in *Sink*-Organen und gesteigerter Saccharose-Efflux weisen sogar auf einen erhöhten Saccharosetransport, was für eine regulatorische Funktion des SUT4 spricht (ausführlicher im Kapitel 5.4.2 besprochen)

Die Veränderungen des Fruchtphänotyps der *SISUT4*-RNAi Tomaten gehen mit frühzeitiger Reife und einer reduzierten Samenproduktion einher. Eine essentielle Rolle für die Entwicklung und Reife von Früchten spielt das gasförmige Phytohormon Etylen (berichtet in De Martinis und Mariani, 1999). In *StSUT4*-RNAi Kartoffeln wurde eine verminderte Expression des Gens *StACO3*, das ein Schlüsselenzym der Etylen-Biosynthese, ACC Oxidase, kodiert, nachgewiesen (Chincinska *et al.*, 2008). Eine Inhibition der ACC Oxidase in transgenen Tabakpflanzen hat die Störung der Ovarien-Entwicklung und die verminderte Fertilität der

Früchte verursacht (De Martinis und Mariani, 1999). Eine potentielle Rolle des Ethylens an der Generierung des Phänotyps der *SUT4*-RNAi Pflanzen, sowie die mögliche Interaktionen zwischen *SUT4* und dem Ethylen-Signaltransduktionsweg wird noch im Kap. 5.5.2 diskutiert.

## **5.4 Analyse des Kohlenhydratgehalts nach *SUT4*-Inhibition**

Expressionsänderungen von verschiedenen Saccharosetransportern können den Kohlenhydrat-Metabolismus verändern (Riesmeier *et al.*, 1994; Kühn *et al.*, 1996; Leggewie, 1996; Bürkle *et al.*, 1998; Hackel *et al.*, 2006; Gottwald *et al.*, 2000; Leggewie *et al.*, 2003). Für die Pflanzen mit einer reduzierten *SUT1*-Expression war z.B. die Akkumulation von Kohlenhydraten in *Source*-Blättern charakteristisch, was durch die Störung der Phloembeladung erklärt wird (Bürkle *et al.*, 1998; Gottwald *et al.*, 2000; Hackel *et al.*, 2006).

### **5.4.1 *SUT4*-Inhibition verursacht globale Veränderungen des Kohlenhydratgehalts**

Die detaillierte Untersuchung des Kohlenhydratgehalts in *SUT4*-RNAi-Kartoffeln, die in verschiedenen Organen, sowohl im LT als auch im KT durchgeführt wurden, haben zahlreiche Veränderungen im Vergleich zum WT gezeigt (Kap. 4.6.-4.10.; Kap. 4.18.2; Kap. 4.18.3; Kap. 4.19.1). Das Profil der Zuckerkonzentrationsänderungen im Laufe der LT-Lichtperiode in WT-*Source*-Blättern stimmte für die löslichen Zucker (maximale Konzentration zur Mitte des Tages) sowie für die Stärke (maximale Konzentration am Ende der Lichtperiode) mit den Literaturdaten überein (Urbańczyk-Wochniak *et al.*, 2005). In *StSUT4*-RNAi Blättern ist im LT die Phase der maximalen Konzentration von löslichen Zuckern zu einem späteren Tageszeitpunkt zu beobachten (Abb. 11). Ausserdem ist der im Laufe der LT-Lichtperiode beobachtete Anstieg der Effluxrate in *StSUT4*-RNAi Blättern viel stärker als beim WT (Abb. 13). Das kann auf eine stark erhöhte Amplitude des Photoassimilateexports aus den *StSUT4*-RNAi *Source* Blättern im Vergleich zum WT hinweisen. Die Phasenverschiebung des Saccharose-Efflux korreliert zum einen mit der Phasenverschiebung der maximalen Akkumulation lösli-

cher Zucker in den *StSUT4*-RNAi *Source* Blättern (Abb. 11, Abb. 13). Zum anderen korreliert der am Ende des Tages erhöhte Efflux mit dem erhöhten Zuckergehalt in terminalen *Sink*-Organen (Abb. 18; Abb. 44; ungezeigte Daten). Die verringerte Effluxrate am Anfang des Tages suggeriert hingegen eine starke Reduktion des Saccharoseexports in der Nacht. Durch die Reduktion des Saccharoseexports könnte man den nach verlängerter Dunkelheit beobachteten Stärkestau erklären (Abb. 12 A).

Die Kohlenhydratbestimmung zeigte, dass die Blätter im KT einen höheren Kohlenhydratgehalt als im LT zeigen (Abb. 11; Abb. 45). Dies stimmt mit den Literaturdaten überein, nach denen für die Pflanzen unter KT-Bedingungen eine erhöhte Photosynthese-Aktivität bezogen auf das Trockengewicht des Blattes und auch eine erhöhte Stärkeakkumulation im Blatt charakteristisch ist (berichtet in Jackson, 1999). Außerdem soll im KT die Exportrate der Saccharose von *Source*-Blättern im Vergleich zum LT ebenfalls erhöht sein (berichtet in Jackson, 1999). Übereinstimmend damit zeigen unsere Beobachtungen, dass die Effluxrate von WT Kartoffeln unter KT-Bedingungen signifikant höher als im LT ist (Abb. 13; Abb. 42). Dagegen konnte man bei den *StSUT4*-RNAi Kartoffeln am Ende der LT-Lichtperiode eine ähnlich hohe Effluxrate beobachten wie sonst nur im KT (Abb. 13; Abb. 42). Da die Knolleninduktion stark durch KT gefördert und durch LT inhibiert ist (Jackson, 1999; Martínez-García *et al.*, 2002b; Rodríguez-Falcón *et al.*, 2006; Chincinska *et al.*, 2008), könnte der erhöhte Saccharose-Export in den *StSUT4*-RNAi Pflanzen möglicherweise an der Knolleninduktion unter LT-Bedingungen verantwortlich sein.

Die beschriebenen Veränderungen des Kohlenhydratprofils bei den *StSUT4*-RNAi Pflanzen weisen auf eine erhöhte Saccharosetransport-Aktivität hin. Der am stärksten in Blättern exprimierte SUT1 ist für den Saccharoseexport aus *Source*-Blättern und für den Langstreckentransport essentiell (Riesmeier *et al.*, 1994, Kühn *et al.*, 1996, Bürkle *et al.*, 1998, Hackel *et al.*, 2006). Die dargestellten Ergebnisse weisen also möglicherweise auf eine Deregulation der SUT1-Aktivität hin. Es stellt sich die Frage, ob SUT4 vielleicht als negativer Regulator von SUT1 funktioniert.



#### 5.4.2 Beeinflusst StSUT4 die Funktion von SUT1 negativ?

In *Source*-Blättern ist *SUT1* stark und *SUT4* sehr schwach exprimiert, dagegen wurde in verschiedenen *Sink*-Organen eine relativ hohe *SUT4*-Expression, aber geringe *SUT1*-Expression festgestellt (Riesmeier *et al.*, 1993; Weise *et al.*, 2000; Kühn *et al.*, 2003; Hackel *et al.*, 2006; Abb. 4.1.2). Die *real time* PCR Expressionsanalysen haben in *Source*-Blättern von *StSUT4*-RNAi Kartoffeln nur eine schwache (und nicht signifikante) Reduktion des *StSUT1*-Transkriptniveaus und dagegen keine Veränderungen der *StSUT2*-Expression festgestellt, was einen regulatorischen SUT4-Effekt auf *SUT2* und *SUT1* auf transkriptionaler Ebene eigentlich ausschließt (Abb. 6).

Eine Interaktion von Saccharosetransportern auf post-transkriptionaler Ebene kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. Saccharosetransporter können zumindest in Hefe Homo- und Heterodimere bilden (durch Yeast-Two-Hybrid Split Ubiquitin Studien gezeigt) und wurden in den Siebelementen des Phloems co-lokalisiert (Reinders *et al.*, 2002). *In planta* konnte eine Interaktion von SUT1 mit SUT1, sowie mit SUT2 über die BiFC-Methode bestätigt werden. Eine Interaktion zwischen dem SUT1- und dem SUT4-Protein über BiFC ist bislang noch nicht gelungen (Krügel *et al.*, 2008; Liesche *et al.*, 2008; nicht gezeigte Daten der AG Kühn).

Bestimmte Aspekte des *StSUT4*-RNAi Phänotyps wie beispielsweise das frühzeitige Blühen und eine Tendenz zu gedrungenem Wuchs wurden früher bereits für SUT1-überexprimierende Tabakpflanzen beschrieben. Kartoffelpflanzen, die ein c-myc-getagtes *SoSUT1*-Gen überexprimieren zeigen ebenfalls dieses Verhalten (Riesmeier und Frommem, 1994; Leggewie, 1996, Leggewie, 1996; persönliche Kommunikation Hongxia He). Bei den *cmyc-SoSUT1* Tabakpflanzen, sowie bei den *StSUT4*-RNAi Kartoffeln wurde eine verminderte Schattenvermeidungsreaktion beobachtet (Kap. 4.13.1; Kap. 4.13.3; Kap. 4.17). Außerdem zeigten die Linien 1 und 12 der *cmyc-SoSUT1* Tabakpflanzen eine reduzierte Samenproduktion (Leggewie, 1996), während für Linien von *StSUT4*-RNAi Tomaten ein verringerter Fruchtertrag, sowie reduzierte Samenproduktion charakteristisch war (Abb 20; Abb. 21).

Überexpression von SUT1 verursachte in den *cmyc-SoSUT1* Tabakpflanzen eine erhöhte Saccharosetransportaktivität, was durch Aufnahmemessungen in Plasmamembranvesikeln dieser Pflanzen gezeigt wurde (Leggiewie, 1996; Leggiewie *et al.*, 2003). Eine Analyse des überexprimierten SUT1-myc Proteins mittels BN-PAGE und Immunodetektion mit monoklonalen c-myc-Antikörpern zeigte, dass sich das überexprimierte Protein lediglich in seiner dimeren Form nachweisen lässt, während die monomere Form nicht detektierbar war. Somit wurde geschlossen, dass die erhöhte Saccharosetransportaktivität in diesen Pflanzen auf die dimere Form zurückzuführen ist. Möglicherweise wirkt das c-terminale myc-tag stabilisierend auf den SoSUT1-Dimer. Eine solche stabilisierende Wirkung ist jedoch aus der Literatur bislang nicht bekannt (Krügel *et al.* 2008; Liesche *et al.* 2008). SUT1 spielt eine essentielle Rolle sowohl für die Phloembeladung, als auch für den Langstreckentransport, was eindeutig anhand von Pflanzen mit reduzierter *SUT1*-Expression gezeigt wurde (Riesmeier *et al.*, 1994, Kühn *et al.*, 1996, Bürkle *et al.*, 1998). Unter Verwendung von  $^{14}\text{CO}_2$  wurde gezeigt, dass die Exportrate radioaktiv markierter Saccharose aus *NtSUT1*-Antisense Tabak-Blättern im Vergleich zum Wildtyp merklich vermindert war (Bürkle *et al.*, 1998). Die SUT1-Aktivität wurde in den *StSUT4*-RNAi-Pflanzen bisher nicht untersucht, jedoch weisen Beobachtungen wie der stark erhöhte Saccharoseefflux am Ende der LT-Lichtperiode oder ein erhöhter Saccharosegehalt in Knollen, sowie im apikalen Sprossmeristem und dazu noch Verschiebungen des diurnalen Rhythmus von Kohlenhydratakkumulation in *StSUT4*-RNAi-Blättern von *StSUT4*-RNAi Kartoffeln auf eine veränderte Zuckertranslokation von *Source*-zu-*Sink* und damit indirekt auf eine mögliche Beteiligung von SUT4 an der SUT1-Regulation hin (Abb. 11, Abb. 13, Abb. 18). Untersuchungen des Chlorophyllgehalts und der Chlorophyllfluoreszenz-Parameter haben gleichzeitig die Möglichkeit ausgeschlossen, dass die bei den *StSUT4*-RNAi Kartoffeln beobachteten Veränderungen des Kohlenhydratmetabolismus mit einer veränderten Photosynthese-Aktivität verbunden sind (Kap. 4.14). Ähnliche Veränderungen im Kohlenhydrat-Metabolismus, wie bei den *StSUT4*-RNAi Kartoffeln wurden bei den Kartoffeln mit einer heterologen Überexpression des *SoSUT1* beobachtet. Die *SoSUT1*-Knollen zeigten einen erhöhten Kohlenhydrat-Gehalt (Leggiewie, 2003). Die Konzentration von löslichen Zuckern in Blättern der *SoSUT1*-Kartoffel war dagegen niedriger als beim Wildtyp (Leggiewie, 2003), was auf Verschiebungen im diurnalen Rhythmus der Kohlenhydratakkumulation hinweisen könnte.

Auf eine SUT1-inhibierende Wirkung des SUT4 kann indirekt der Einfluss der Expression von Saccharosetransportern auf die arbuskuläre Mykorrhiza hinweisen (Boldt *et al.* unpubliziert). Während die Wurzelkolonisation durch den Mykorrhizapilz *Glomus mosseae* bei den Antisense *SISUT1*-Tomaten (Hackel *et al.* 2006) im Vergleich zum WT unverändert war, zeigten die *SISUT4*-RNAi Tomaten eine signifikant erhöhte Anzahl von infizierten Wurzelfragmenten. Zudem waren die Mykorrhiza-Parameter Kolonisation, Kapazität und Arbuskelformation in *StSUT4*-RNAi Tomaten signifikant erhöht. Diese Ergebnisse weisen auf eine erfolgreichere Belieferung der Mykorrhizapilze mit Kohlenhydraten durch die *StSUT4*-RNAi Tomaten hin (Boldt *et al.* 2009 unpubliziert).

Anhand der oben beschriebenen Daten kann man spekulieren, dass eine SUT4-vermittelte post-translationale Regulation des SUT1 stattfindet. Neuere Daten zeigen, dass die Redox-abhängige SUT1-Homodimerisierung für die Regulation der SUT1-Aktivität von grosser Bedeutung ist (Krügel *et al.* 2008; Liesche *et al.* 2008). Eine negative Regulation der SUT1-Aktivität durch SUT4, z.B. durch Verhinderung der SUT1-Homodimerisierung könnte viele der bei den *StSUT4*-RNAi Pflanzen beobachtenden Effekte erklären.

#### **5.4.3 Die Aktivität der AGPase ist in *StSUT4*-RNAi Kartoffeln dereguliert**

Die *SUT4*-Expression verändert sich im Laufe der Knollenentwicklung und scheint in perimedullären Regionen höher zu sein als im Cortex der Kartoffelknolle (Abb. 1). Es ist bekannt, dass der Stärkegehalt in Knollen in peripheren Regionen höher als im zentralen Bereich ist (Bologa *et al.*, 2003). Eine Analyse der Stärkeakkumulation in verschiedenen *Sink* und *Source* Kartoffel-Organen hat Veränderungen des Stärkegehalts nach der Reduktion der *StSUT4*-Expression festgestellt (Abb.10 C; Abb. 12; Abb. 14; Abb. 15; Abb. 18; Abb. 41). Es stellt sich die Frage, ob SUT4 bei der Regulation der Stärke-Biosynthese oder des Stärke-Abbaus eine Rolle spielt?

Für transgene *StSUT4*-RNAi Kartoffeln war ein erhöhter Stärkegehalt in Blättern während einer verlängerten LT-Dunkelperiode charakteristisch (Abb. 11 A). Die Stärke-Färbung weist auf eine erhöhte Stärkeakkumulation in den *StSUT4*-RNAi Blättern in der Mitte der KT-Lichtperiode, während die Stärke in den WT Blättern zu diesem Zeitpunkt noch nicht detektierbar war (Abb. 41 A). In WT-Kartoffelpflanzen ist der Stärkegehalt diurnalen Schwankungen unterworfen und maximale Stärkeakkumulation ist am Ende der Lichtperiode zu beobachten (Urbańczyk-Wochniak *et al.* 2005). Mittels quantitativer Stärke-Bestimmung im Laufe des Tages wurde gezeigt, dass die nach Stärke-Färbung beobachteten Unterschiede auf eine im Tagesrhythmus verschobene Phase der Stärkeakkumulation in *StSUT4*-RNAi Kartoffeln zurückzuführen sind (Abb. 12 A B; Abb. 41 B).

Eine bedeutende Rolle bei der Steuerung der Stärke-Biosynthese in Blättern und in Knollen spielt die Redox-Regulation der ADP-Glucosepyrophosphorylase (AGPase) (Müller-Röber *et al.*, 1992; Tiessen *et al.*, 2002; Hendriks *et al.* 2003; Geigenberger, 2003; Kolbe *et al.*, 2005). Analyse der Redox-Aktivierung von AGPase in *Source*-Blättern im KT haben bei den *StSUT4*-RNAi Kartoffeln einen erhöhten Gehalt von AGPB-Monomeren also der aktiven (reduzierten) Enzymform festgestellt (Abb. 43).

In Blättern kann die AGPase-Redox-Aktivierung durch ein Licht-abhängiges System geschehen, was die Aktivierung von Photosynthese-abhängigen Prozessen erfordert. Infolge der Übertragung von Elektronen durch den photosynthetischen Elektronentransport zum Ferredoxin-Thioredoxin System und dann auf AGPase kommt es zur Monomerisierung des Enzyms, was ihm für eine allosterische Aktivierung empfänglich macht (Geigenberger *et al.*, 2005; berichtet in Kolbe *et al.*, 2005). Da weder die Ergebnisse der Analyse der Chlorophyll-Fluoreszenz, noch die Bestimmung von Chlorophyllgehalten (Kap. 4.14) auf signifikante Veränderungen in den photosynthetischen Prozessen bei den *StSUT4*-RNAi Pflanzen im Vergleich zum WT hinweisen, kann man annehmen, dass die erhöhte AGPase-Aktivität bei den Pflanzen mit reduzierter *SUT4*-Expression lichtunabhängig ist. Auf die lichtunabhängige AGPase-Redox-Aktivierung weist auch die mittels qualitativer Methode bestimmte erhöhte Stärkeakkumulation in *StSUT4*-RNAi Blättern während der verlängerten LT-Dunkelperiode hin (Abb. 12 A). Außerdem wurde die erhöhte Stärkekonzentration auch in den nicht-photosynthetischen Organen von *StSUT4*-RNAi Kartoffeln, in Knollen festgestellt (Abb. 10

C; Abb. 15; Abb. 18), was auf Veränderungen der AGPase-Aktivierung auch in heterotrophen Geweben hinweist. Da der Zuckergehalt nicht nur in Blättern, sondern auch in Knollen diurnal oszilliert (Geigenberger und Stitt, 2000; Bläsing *et al.* 2005), kann man nicht ausschließen, dass die in der *StSUT4*-RNAi Knolle (Abb. 18) beobachteten Unterschiede im Stärkegehalt lediglich aufgrund einer Phasen-Verschiebung der Stärkeakkumulation in *StSUT4*-RNAi Kartoffeln zu sehen sind.

Sowohl in photosynthetischen Organen als auch in heterotrophen Geweben kann die posttranslationale AGPase-Redox-Aktivierung auch durch Zucker-Induktion vorkommen. Es wurde beobachtet, dass eine Aktivierung der AGPase in Blättern und Knollen eng mit dem Saccharose-Gehalt korreliert (Tiessen *et al.*, 2002; Hendriks *et al.*, 2003; Lunn *et al.*, 2006). Es wurde postuliert, dass Trehalose-6-Phosphat (T6P) die Saccharose-abhängige Induktion der Stärke-Synthese vermittelt (Wingler *et al.*, 2000; Kolbe *et al.*, 2005; Lunn *et al.*, 2006). Aus durchgeführten Analysen folgt, dass eine erhöhte Zuckerverfügbarkeit im Zytoplasma die T6P-Synthese zu fördern scheint. Das T6P-Molekül wird vom Zytoplasma zum Plastiden transportiert, wo durch Erhöhung der Thioredoxin-vermittelten AGPase-Redox-Aktivierung die lichtunabhängige Stärkesynthese induziert wird (Kolbe *et al.*, 2005). Es ist bisher nicht geklärt, wie es zur Erkennung einer erhöhten Zuckerverfügbarkeit und damit zur Induktion der T6P-Molekül-Synthese kommt (Kolbe *et al.*, 2005). In Knollen wurden zwei getrennte Signalwege der Zucker-abhängigen AGPase-Redox-Aktivierung beschrieben. Glukose-abhängige Redox-Aktivierung, die durch Hexokinase vermittelt ist und Saccharose-abhängige Redox-Aktivierung, für die als mögliches Saccharose-Sensorprotein ein SnRK1 (SNF1-related protein kinase) postuliert wurde (Tiessen *et al.*, 2003).

Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen auf eine Rolle des SUT4 bei der Regulation der Stärke-Biosynthese hin. Welche Funktion das Plasmamembran-Protein SUT4 in diesem Zusammenhang übernimmt, bleibt mit Hilfe weiterer Untersuchungen zu klären. Die fehlende Korrelation zwischen Saccharose- und Stärkegehalt in den verschiedenen Geweben der *StSUT4*-RNAi-Kartoffelpflanzen kann für einen regulativen Einfluss des SUT4 auf die Stärke-Biosynthese *downstream* von einem Saccharose-Signal sprechen.

#### 5.4.4 Hat Saccharose als Signalmolekül eine Bedeutung für die Generierung des *StSUT4*-RNAi Phänotyps?

Das SUT4-Protein wurde unter anderem im Phloem von *Source*-Blättern detektiert, was auf eine Rolle von SUT4 auch in *Source*-Organen hinweist (Weise *et al.*, 2000, Reinders *et al.*, 2002). Die *SUT4*-Expression in *Source*-Blättern ist sehr schwach, kann jedoch, wie es früher diskutiert wurde (Kap. 5.4.2), essentiell für die Regulation des Saccharoseexports (möglicherweise über die Regulation des SUT1 Proteins) sein. Es gibt Hinweise darauf, dass die *SUT4*-Expression in *Source*-Blättern durch Licht und/oder durch eine innere Uhr reguliert ist (Kap. 5.1.3), was auf ihre Bedeutung für die durch Licht-Qualität und -Quantität regulierten Prozessen hinweisen kann. Effekte der *StSUT4*-Expressionreduktion betreffen vor allem *Sink*-Organe, was mit der *Sink*-spezifischen *SUT4*-mRNA-Akkumulation übereinstimmt (Abb. 1, Abb. 9, Abb. 10). Davon betroffen sind vor allem physiologische Prozesse, wie die Knollenproduktion und Blühinduktion, die einer starken Licht-Regulation unterliegen. Für die Lichtaufnahme von der Umwelt sind vor allem Photorezeptoren in *Source*-Blättern verantwortlich. In *Source*-Blättern kommt es zur Generierung eines Langstreckensignals, das für den Informationstransport von den Photorezeptoren zu dem apikalen Sprossmeristem verantwortlich ist und letztendlich zur Induktion der Blüte bzw. der Knollenbildung führt (Lough und Lucas 2006; Rodríguez-Falcón *et al.*, 2006). Die Natur eines solchen Signals wurde bisher nicht eindeutig geklärt. Es wurde postuliert, dass dieses Signal eine komplexe Form hat und aus mehreren Komponenten (aus Aktivatoren und Inhibitoren) besteht (Bernier und Périlleux, 2005; Lough und Lucas, 2006). Durch Pfropfversuche zwischen verschiedenen Pflanzenarten wurde eine sehr universelle Natur eines solchen Stimulus gezeigt, und dasselbe Signal kann sowohl zur Blühinduktion wie auch zur Knolleninduktion führen (Bernier und Périlleux, 2005; Lough und Lucas 2006 Rodríguez-Falcón *et al.*, 2006).

Wie es die Pfropfversuche von *StSUT4*-RNAi und WT Kartoffelpflanzen gezeigt haben, ist auch das für frühzeitiges Erblühen und frühere Knollenbildung verantwortliche Signal zwischen gepfropften Pflanzen übertragbar (Kap. 4.19). Die Blüh- bzw. Knolleninduktionssignalübertragung war stark von der Anwesenheit der *Source*-Blätter abhängig (Abb. 46; Abb. 47 A und B; Abb. 48), was auf eine wichtige Rolle des SUT4 nicht nur in *Sink*-Organen, sondern auch in *Source*-Blättern hinweist. Dort kann SUT4 an der Generierung eines Blühinduktions- bzw. Knolleninduktionsstimulus beteiligt sein.

Es wurde in der Literatur diskutiert, dass die Mobilität eines Phloem-mobilen Signals unter anderem von der Stärke des Assimilaten-Massenstroms abhängig ist (Thomas, 2006). Dabei wird in Betracht gezogen, dass die von Blättern exportierten Photoassimilate ebenfalls als Komponenten eines Phloem-mobilen Signals in Frage kommen (Bernier und Périlleux, 2005). Die photosynthetische Aktivität war jedoch bei den *StSUT4*-RNAi Pflanzen vermutlich nicht stark verändert (Kap. 4.14).

Dagegen wurde bei den Kartoffeln mit reduzierter *StSUT4*-Expression ein zeitlicher Anstieg der Saccharose-Effluxwerte am Ende der LT-Lichtperiode beobachtet (Abb. 13), wobei die maximalen Werte mit den Saccharose-Efflux-Werten in WT-Pflanzen unter induktiven KT-Bedingungen vergleichbar sind (Abb. 42). Wie es schon postuliert wurde (Kap. 5.4.1), könnte die erhöhte Saccharoseexport-Aktivität im LT für die frühere Knolleninduktion bei *StSUT4*-RNAi Désirée verantwortlich sein und im Fall von *StSUT4*-RNAi Andigena sogar die Knolleninduktion unter nicht-induktiven LT-Bedingungen ermöglichen (Jackson, 1999; Martínez-García *et al.*, 2002b; Rodríguez-Falcón *et al.*, 2006; Chincinska *et al.*, 2008).

Zahlreiche Literaturdaten verweisen auf die Bedeutung von Saccharose als Langstreckensignal-Molekül (Corbesier *et al.*, 1998; Bernier und Périlleux, 2005; Eriksson *et al.*, 2006; Rodríguez-Falcon *et al.*, 2006). So kann Saccharose *in vitro* die Knollenbildung induzieren und eine Erhöhung der Saccharosekonzentration in Stolonen führt zu einer verstärkten Knollenbildung (Xu *et al.* 1998a; Müller-Rober *et al.* 1992; Jackson, 1999). Die photoperiodische Blühinduktion in *Sinapis alba* geht mit einem raschen und transienten Anstieg von Saccharose im Phloemexudat des apikalen Sprossgewebes einher (Havelange *et al.* 2001; Bernier und Périlleux, 2005). In *Arabidopsis* korreliert die Blühinduktion unter nicht-induktiven Kurztagsbedingungen mit einem gleichzeitigen kurzen Anstieg der Konzentration von Saccharose und GA<sub>4</sub> im Apex (Eriksson *et al.*, 2006). Es konnte gezeigt werden, dass eine externe Applikation von Saccharose den spät-blühenden Phänotyp von *Arabidopsis* Blühinduktions-Mutanten (*gi*, *co*, *fca* oder *phyA*) teilweise komplementieren kann (Roldán *et al.* 1999; Bernier und Périlleux, 2005). Interessanterweise gelang es nicht, den Phänotyp der *ft* Mutante durch eine äussere Zufuhr von Saccharose zu komplementieren, was auf eine Saccharose-Wirkung *upstream* von FT hinweist (Roldán *et al.*, 1999; Bernier und Périlleux, 2005). Auch in Solanaceen, und zwar in Tomaten, wurden mit Saccharose positive Effekte auf die Blühinduktion

*in vitro* erzielt (Dielen *et al.*, 2002). Die Bedeutung des Saccharose-Signals für die Blühinduktion wurde eindeutig auch im Fall von spät blühenden transgenen Pflanzen der Art *Nicotiana glauca* beobachtet, die infolge der Co-Suppression einer Plasmamembran  $H^+$ -ATPase eine reduzierte Exportrate von Saccharose aus Blättern und einen reduzierten Zuckergehalt in Blütenknospen zeigten (Zhao *et al.*, 2000). Detaillierte Analysen des Saccharosegehalts im Apex im Laufe der Entwicklung von Désirée Kartoffeln weisen auf eine Korrelation zwischen einer gesteigerten Saccharosekonzentration und dem Zeitpunkt des erstmaligen Erscheinens von Blütenknospen bei den WT sowie bei den früh blühenden *StSUT4*-RNAi Pflanzen hin (Abb. 44), was die Bedeutung von Saccharose für die Blühinduktion bei den Kartoffeln ebenfalls bestätigt. Man kann postulieren, dass die Saccharose eine wichtige Rolle an der Generierung des früh blühenden Phänotyps von *StSUT4*-RNAi Kartoffeln spielt (Abb. 44).

## **5.5 Veränderungen der GA-Antwort sind teilweise für den Phänotyp der *StSUT4*-RNAi Kartoffeln verantwortlich**

Da Gibberelline an der Wachstumsregulation und an der Regulation des Blühverhaltens der Pflanzen beteiligt sind, sowie als Inhibitoren der Knolleninduktion wirken (zur Übersicht Schopfer und Brennicke, 1999; Taiz und Zeiger, 2006), wurde ihre Beteiligung an der Ausbildung der phänotypischen Merkmale der *StSUT4*-RNAi-Pflanzen postuliert. Die bei den *StSUT4*-RNAi Kartoffeln beschriebenen Phänotypeneffekte (Tendenz zum reduzierten Wachstum und Knollenbildung im LT; Kap. 4.5 und Kap. 4.22) erinnern an Pflanzen, die Störungen im GA-Metabolismus oder GA-Signaling zeigen (Van den Berg *et al.*, 1995; Jackson, 1999; Rodríguez -Falcón *et al.*, 2006). Ähnliche Phänotyp-Effekte zeigen Pflanzen, die mit einem GA-Biosynthese-Inhibitor, z.B. Paclobutrazol, behandelt wurden (Jackson und Prat, 1996; Jackson, 1999; Amador *et al.*, 2001, Rodríguez -Falcón *et al.*, 2006).

Der Versuch der Komplementation des *StSUT4*-RNAi Phänotyps durch Behandlung mit einer aktiven GA-Form,  $GA_3$ , die hinsichtlich Struktur und Metabolismus sehr ähnlich der in Kartoffeln häufigen  $3\beta$ -hydroxylierten  $GA_1$  ist (zur Übersicht Schopfer und Brennicke, 1999;



Rodríguez-Falcón *et al.*, 2006), führten allerdings nicht zur Wiederherstellung des WT-Phänotyps (Kap. 4.12.1). Das Stängelwachstum nach GA<sub>3</sub>-Behandlung war bei den *StSUT4*-RNAi Kartoffeln immer schwächer als beim WT (Abb. 22, Abb. 23), was auf eine reduzierte GA-Antwort in den transgenen Pflanzen hinweist. Die Ergebnisse stehen in guter Übereinstimmung mit Daten aus *in vitro* durchgeführten Experimenten, nach denen auf GA<sub>3</sub>-haltigem 2MS-Medium ein reduziertes Wachstum von *StSUT4*-RNAi-Seitentrieben zu beobachten war (Abb. 26).

Das Blühverhalten der *StSUT4*-RNAi Kartoffelpflanzen veränderte sich nicht nach GA<sub>3</sub>-Behandlung, während die WT-Pflanzen noch später blühen als der unbehandelte WT (Abb. 24). Obwohl in vielen Pflanzenarten eine für das Blühen positive Wirkung von Gibberellin bekannt ist (Wilson *et al.*, 1992; Xu *et al.*, 1997; Reeves und Coupland, 2001; Bernier und Périlleux, 2005; Eriksson *et al.*, 2006), ist für andere auch eine für die Blühinduktion inhibierende Wirkung von Gibberellin beschrieben. Beispielsweise wurde sowohl für die tagneutrale Tomate, als auch die KT-Pflanzen *Fuchsia hybrida* unter KT-Bedingungen eine inhibierende Wirkung durch Gibberellin auf die Blühinduktion festgestellt (King und Ben-Tal, 2001; Die-len *et al.* 2001). Der in den GA<sub>3</sub>-behandelten WT-Kartoffelpflanzen beobachtete spätere Blühzeitpunkt (Abb. 24) weist ebenfalls auf einen inhibierenden Einfluss von GA auf die Blühinduktion hin. Dagegen schienen die *StSUT4*-RNAi Kartoffeln gegenüber der GA<sub>3</sub>-Behandlung insensitiv zu sein.

Auch die Knollenbildungsinduktion ist durch GAs stark inhibiert (Rodríguez-Falcón *et al.* 2006), und dieser Prozess ist mit einer starken Reduktion des endogenen GA-Gehalts, vor allem GA<sub>1</sub>, korreliert (Macháčková *et al.* 1998; Martínez-García *et al.* 2002a Rodríguez-Falcón *et al.* 2006). Ein erhöhtes GA-Niveau inhibiert dagegen die Knollenbildung (Jackson, 1999). Übereinstimmend damit ist die Reduktion des Knollenertrags, die bei den WT-Kartoffeln nach GA<sub>3</sub>-Behandlung beobachtet wurde (Abb. 25). Die transgenen *StSUT4*-RNAi Kartoffelpflanzen zeigten dagegen nach der GA<sub>3</sub>-Behandlung einen höheren Knollenertrag, der sich in der Zunahme von Knollenanzahl widerspiegelte (Abb. 25).

Die beobachteten *StSUT4*-RNAi Phänotypeneffekte können durch reduzierte Expression eines GA-Biosynthese-Enzyms, der GA20 Oxidase *StGA20ox1* (Carrera *et al.* 1999) zu einem geringeren GA-Gehalt in den *StSUT4*-RNAi Kartoffeln führen. Tatsächlich wurde in den transgenen Pflanzen verringerte Transkriptmengen der *StGA20ox1* gemessen (Abb. 27). Für die GA20 Oxidase wurde ein *feedback* Kontrollmechanismus beschrieben. Es kann sein, dass die GA<sub>3</sub>-Applikation eine negative *feedback*-Inhibierung der *StGA20ox1*-Expression verursacht (Carrera *et al.* 1999), und dadurch eine Wiederherstellung des WT-Phänotyps verhindert. Neben der reduzierten *StGA20ox1*-Expression verweisen auch die Ergebnisse der *in vitro* Knollenbildung auf einen reduzierten endogenen GA-Gehalt in den *StSUT4*-RNAi Kartoffelpflanzen. Eine erhöhte Saccharosekonzentration im Medium führt zum Abfall des endogenen GA-Gehalts, vor allem des 3β-hydroxylierten GA<sub>1</sub> was die Knollenproduktion ermöglicht (Xu *et al.*, 1998a; Rodríguez-Falcón *et al.*, 2006). Auf 8MS Medium zeigten *StSUT4*-RNAi Kartoffelpflanzen einen höheren Knollenertrag als der WT, was auf eine starke Reduktion des endogenen GA-Gehalts bei den transgenen Pflanzen hinweisen kann (Abb 16, Abb 17).

Die bei den *StSUT4*-RNAi beobachteten Effekte kann man auch durch eine reduzierte GA-Sensitivität erklären. In diesem Fall könnte man sogar von einem erhöhten Gehalt von endogenen GAs ausgehen. Die *StSUT4*-RNAi Kartoffeln könnten jedoch wegen der möglicherweise reduzierten GA-Sensitivität auf die erhöhte GAs sowie GA<sub>3</sub>-Behandlung nicht reagieren. Ein zusätzliches Argument dafür liefert der Befund, dass die *StSUT4*-RNAi Kartoffeln kaum auf die Behandlung mit dem GA-Biosynthese Inhibitor, Paklobutrazol, reagierten (Chincinska *et al.*, 2008).

Bei der GA-insensitiven Andigena *gai-1* Mutante, die wegen einer Deletion im DELLA-Protein zur GA-abhängigen DELLA-Degradation unfähig ist, wurde ein Zwergphänotyp und eine frühzeitige Knollenbildung im KT beobachtet (Rodríguez -Falcón *et al.* 2006). Die GA-insensitive *gai-1* Mutante war jedoch unfähig, Knollen unter LT-Bedingungen herzustellen (Rodríguez -Falcón *et al.* 2006). Eine Theorie besagt, dass zwar eine lokale Reduktion des GA-Gehalts (oder der GA-Sensitivität) im Stolon für die Induktion der Knollenbildung nötig ist, dass dies jedoch unter LT-Bedingungen für die Knollenbildungsinduktion nicht ausreichend ist. Die Induktion der Knollenbildung im LT scheint daher zusätzlich von einem GA-regulierten, Langstreckensignal abzuhängen (Rodríguez-Falcón *et al.*, 2006). Dagegen führt

die herabgesetzte Reduktion der GA-Sensitivität bei den *StSUT4*-RNAi Kartoffeln nicht nur zur Inhibierung des Längenwachstums und zur Förderung der Blühinduktion, sondern auch zur Knollenbildung unter LT-Bedingungen (Abb. 22, Abb. 23, Abb. 24, Abb. 25, Abb. 26). Im Gegensatz zu den *gai-1* Mutanten, kam es also bei den *StSUT4*-RNAi-Pflanzen unter GA-Kontrolle zur Bildung eines knollen-induzierenden Langstrecken-Signals, was eine vollständige GA-Insensitivität dieser Pflanzen ausschliesst.

Somit scheint GA eine duale Funktion übernehmen: Sie inhibiert durch lokale Anreicherung die Knollenbildung in Stolonen und kann wiederum ein Signal zur Knollenbildung in den Blättern induzieren. Nach neuesten Erkenntnissen ist eine lokale Steigerung der GA2ox1-Aktivität in der apikalen Stolonzone für die GA<sub>1</sub>-Degradation verantwortlich (Kloosterman *et al.* 2007). Transgene Kartoffelpflanzen mit einer konstitutiven GA2ox1-Suppression zeigten bis auf eine veränderte Knollenmorphologie einen nahezu unveränderten Phänotyp. Infolge der Suppression der GA2ox1- wiesen die Knollen während der frühesten Entwicklungsphase eine stark verlängerte Form auf, die auf eine starke Akkumulation von GA<sub>1</sub> und GA<sub>20</sub> in diesen Knollen zurückgeführt wurde (Kloosterman *et al.*, 2007). Einen ähnlichen Phänotyp zeigten die Knollen von GA<sub>3</sub>-behandelten *StSUT4*-RNAi Kartoffelpflanzen (Abb. 25 A), so dass auch hier ein erhöhter GA-Gehalt in Betracht kommt. Möglicherweise ist GA nicht nur an der Induktion der Knollenbildung beteiligt, sondern beeinflusst auch den Verlauf der weiteren Knollenentwicklung. An solch einer Regulation können mehrere getrennte GA-Signalwege beteiligt sein, die durch gegenseitige Wechselwirkungen gekennzeichnet sind. Da die GA<sub>3</sub>-Behandlung in Wildtyp-Kartoffelpflanzen zu einer erhöhten *SUT4*-Expression führte (Chincinska *et al.*, 2008), könnte man spekulieren, dass *SUT4* an einen oder mehreren dieser Signalwege beteiligt ist.

Die fehlende GA-Antwort oder ein niedriger endogener GA-Gehalt scheinen für die Ausbildung des Phänotyps der *StSUT4*-RNAi Pflanzen verantwortlich zu sein. Allerdings ist zu berücksichtigen, dass eine Inhibierung der GA-Biosynthese bzw. der GA-Antwort allein nicht ausreichend ist, um die strenge photoperiodische Abhängigkeit der Knollenbildung bei Andigena-Kartoffeln aufzuheben (Rodríguez -Falcón *et al.* 2006). Der Phänotyp der Kartoffelpflanzen mit verminderter Expression der *GA20-Oxidase* war durch verkürzte Internodien im LT, eine frühere Knolleninduktion sowie einen erhöhten Knollenertrag im KT gekennzeichnet.

net. Jedoch bildeten diese Pflanzen wie auch die GA-insensitive Andigena-Mutante, *gai-1* im LT keine Knollen aus (Carrera *et al.* 2000; Rodríguez -Falcón *et al.* 2006). Dagegen waren zwar die GA-Biosynthese Mutante *ga-1* sowie die durch einen GA-Biosynthese-Inhibitor behandelten Pflanzen zur Knollenherstellung im LT fähig, jedoch erst nach mehr als 5 Monaten der Anzucht, also viel später als unter KT Bedingungen, was darauf hinweist, dass die Reaktion auf die Photoperiode bei diesen Pflanzen nicht verändert wurde (Van den Berg *et al.*, 1995; Jackson, 1999; Carrera *et al.*, 2000; Rodríguez -Falcón *et al.*, 2006). Zur Knolleninduktion im LT kommt es dagegen bei den *StSUT4*-RNAi Andigena ziemlich schnell, schon im zweiten Monat (Kap. 4.22.1). Noch schneller als bei den *StSUT4*-RNAi Andigena kommt es zur Knollenbildung bei den anti-PhyB Andigena Kartoffeln, was durch Störungen der photoperiodischen Antwort bei den Pflanzen erklärt werden kann (photoperiode-insensitiv) (Jackson *et al.*, 1996). Anhand der vorgestellten Daten sollten deswegen weitere Faktoren in zukünftigen Projekten untersucht werden, die an der Entstehung der *StSUT4*-RNAi Phänotypeneffekte zusammen mit GA teilnehmen könnten, z.B andere Pflanzenhormone, sowie Phytochrome und Cryptochrome.

### **5.5.1 Mögliche Interaktion zwischen GA-Antwort und dem Saccharose-Weg**

Auf die essentielle Bedeutung eines im Blatt generierten Signals für die Knollenbildung weisen eindeutig die Ergebnisse von Pfropfversuchen der *StSUT4*-RNAi und WT-Kartoffeln hin (Kap. 4.20). Wie schon im Kap 5.4.4. diskutiert wurde, kann die Saccharose selbst als ein solches Phloem-mobiles Signal dienen. Der Knollenertrag bei den *StSUT4*-RNAi Kartoffeln war nach der GA<sub>3</sub>-Behandlung verstärkt. Interessanterweise umfasste der infolge von GA<sub>3</sub>-Behandlung erhöhte Knollenertrag nicht nur eine Knollengewichtssteigerung, sondern vor allem eine erhöhte Knollenanzahl (Abb. 25 A und C). Eine verstärkte Knollen-Produktion wurde früher bei den transgenen Kartoffeln beschrieben, die infolge einer Knollenspezifischen AGPase-Inhibition einen wesentlichen Saccharosekonzentrations-Anstieg in Stolonen zeigten. Die Saccharose in Stolonen beeinflusst also positiv die Knollenzahl (Müller-Rober *et al.*, 1992; Jackson, 1999). Obwohl ein zeitlich verstärkter Saccharoseefflux sowie ein erhöhter Zuckergehalt in terminalen *Sink*-Organen bei den *StSUT4*-RNAi Kartoffeln nachgewiesen wurde, zeigten die Pflanzen unter normalen Anzuchtbedingungen keine erhöhte Anzahl von Knollen, jedoch nach GA<sub>3</sub>-Behandlung (Abb. 13, Abb. 15, Abb. 18). Dies

weist darauf hin, dass die Saccharose-induzierte Knollen-Produktion auch von einer positiven GA-Wirkung abhängen kann. Ein positiver Einfluss für GA auf die Knollen-Produktion wurde neben der Inhibitionsfunktion schon früher anhand der Beobachtung von *gai-1* Mutanten postuliert (Rodríguez -Falcón *et al.* 2006).

Wie es in der Literatur beschrieben wurde, kann die Reaktion auf Saccharose mit der Reaktion auf GAs sowohl synergistisch als auch antagonistisch auf verschiedene physiologische Prozesse wirken. In *Arabidopsis* wurde eine synergistische Wirkung von Saccharose und GA<sub>4</sub> für die Blühinduktion postuliert (Eriksson *et al.*, 2006). Eine GA-Zugabe zum *in vitro* Wachstumsmedium reduzierte dagegen die Saccharose-induzierte Blühinduktion in Tomaten, was auf einen antagonistischen Effekt von beiden Substanzen auf das Blühverhalten hinweist (Dielen *et al.* 2001).

Aus *in vitro* durchgeführten Experimenten folgt, dass die Elongation von Seitentrieben der WT-Kartoffeln zwar viel stärker als *StSUT4*-RNAi Kartoffeln durch GA<sub>3</sub>-Zugabe induziert wurde, jedoch nur auf dem Medium mit relativ geringem Saccharosegehalt (2% w/v), während es auf dem Medium mit der erhöhten Saccharosekonzentration zur Reduktion der GA-Antwort bei den WT-Pflanzen kam (Abb. 26). Diese Ergebnisse können auf eine antagonistische Wachstums-Regulations-Wirkung von GA und Saccharose bei den Kartoffeln hinweisen. Eine mögliche Integration von genetischen Wegen der Saccharosesignaltransduktion und der GA-Signalübertragung sollte in Betracht gezogen werden. Wie bereits bekannt, verursacht eine hohe Saccharosekonzentration im Knolleninduktionsmedium die Reduktion des endogenen GA-Gehalts, insbesondere des GA<sub>1</sub>-Niveaus in *in vitro* Stecklingen, was zur Induktion von Mikroknollenherstellung, sowie zu einer erheblichen Reduktion des Seitentriebwachstums führt (Xu *et al.* 1998a; Abb. 16, Abb. 17, Abb. 26). *StSUT4*-RNAi Kartoffeln reagieren jedoch auf diese Saccharose-Behandlung nicht mit einer Reduktion des Seitentriebwachstums. Interessanterweise ergab eine gleichzeitige Behandlung von *StSUT4*-RNAi und WT Kartoffelpflanzen mit GA und Saccharose einen Ausgleichseffekt von beiden Phänotypen (Komplementationseffekt von *StSUT4*-RNAi Kartoffelpflanzen?) (Abb. 26). Vielleicht kann dies darauf hinweisen, dass es bei den *StSUT4*-RNAi Kartoffeln zu einer verminderten Empfindlichkeit gegenüber Saccharose und GA kommt. Vielleicht bewirkt eine durch *SUT4*-Inhibition verursachte Reduktion der Saccharose-Empfindlichkeit einen *feedback* regulierten

Verlust der GA-Sensitivität? Literatur-Daten scheinen solche Möglichkeit theoretisch zu bestätigen (Gibson *et al.*, 2001; Achard *et al.*, 2003; Solfanelli *et al.* 2006; Loreti *et al.*, 2008).

Modifizierung der Saccharose-Antwort durch Hormone, sowie Einfluss von Saccharose auf die Wege der hormonellen Signal-Übertragung wurde unter anderem für *sis1/ctr1-1* Mutanten beschrieben (Gibson *et al.*, 2001; Achard *et al.*, 2003). Ein anderes Beispiel für die durch GA-modifizierte Saccharose-Antwort ist die Regulation der Biosynthese von Anthocyanen. Die Transkription von Saccharose-induzierbaren Genen des Anthocyan-Biosynthese-Wegs ist stark durch GA reprimiert (Solfanelli *et al.*, 2006; Loreti *et al.*, 2008). Interessanterweise waren Arabidopsis *gai* Mutanten weniger sensitiv auf die GA-vermittelte Repression eines Saccharose-induzierbaren Anthocyan-Biosynthese-Enzyms, Dihydroflavonal Reduktase. Anhand dieser Daten wurde postuliert, dass GAI, ein DELLA-Protein, als ein Integrator des Saccharose-Signalwegs und des GA-Antwortwegs funktioniert (Loreti *et al.*, 2008). In *StSUT4*-RNAi Kartoffeln wurde unter normalen Anzuchtbedingungen ein stark reduzierter Anthocyan-Gehalt in Blättern festgestellt (Abb. 36). Auch die hellere Farbe von *StSUT4*-RNAi Knollen weist auf eine reduzierte Anthocyan-Produktion in transgenen Knollen hin (Abb. 25 A). Vielleicht kann die postulierte Saccharose-Insensitivität der *StSUT4*-RNAi Kartoffeln eine Erklärung für den erniedrigten Anthocyan-Gehalt sein. Nach GA<sub>3</sub>-Behandlung sind sowohl *StSUT4*-RNAi Knollen wie auch WT-Knollen noch heller geworden, was auf weitere Senkung des Anthocyan-Gehalts hinweist (statistisch nicht ausgewertet) und mit Literatur-Daten, die eine inhibierende Wirkung von Gibberellinen auf die Anthocyan-Biosynthese postulieren, übereinstimmt (Solfanelli *et al.*, 2006; Loreti *et al.*, 2008).

Aufgrund der dargestellten Beobachtungen kann man also suggerieren, dass eine wechselseitige Regulationswirkung zwischen der Saccharoseantwort und dem GA-Signalweg infolge der SUT4-Inhibition in den Kartoffelpflanzen stark modifiziert wurde.

### 5.5.2 Mögliche GA-Ethylen Interaktion

Ethylen ist ein Wachstumsregulator, der auch an Prozessen der Blühinduktion und dem Reifen von Früchten beteiligt ist und eine Rolle bei der Schattenvermeidungsreaktion spielt (Pierik *et al.*, 2004a). Bei Ethylen-insensitiven Mutanten oder transgenen Pflanzen kann man Eigenschaften beobachten, die an die Folgen der *StSUT4*-Inhibierung erinnern. Die Pflanzen zeigen unter anderem ein retardiertes Wachstum, was am deutlichsten bei eng stehenden (beschatteten) Pflanzen zu beobachten ist (Pierik *et al.*, 2004b; berichtet in Pierik *et al.*, 2006).

Es gibt einen Zusammenhang zwischen Ethylen und der Gibberellin- und Saccharose-Antwort. Auf eine solche Interaktion weisen unter anderem Analysen von den *ctr1-1* (*constitutive triple response*) Arabidopsis-Mutanten, die eine konstitutive Ethylen-Antwort zeigen und allelisch zu *sis1* (*sucrose insensitive 1*) Mutanten sind (Achard *et al.*, 2003). Die *sis1/ctr1-1* Mutante zeigen keine Saccharose-vermittelte Inhibierung der Keimlingsentwicklung. Der *sis1/ctr1-1* Phänotyp erinnert an Pflanzen mit reduzierter GA-Antwort und ist selbst in Anwesenheit von GA-Biosyntheseinhibitor, Paclobutrazol, zur Keimung fähig (Gibson *et al.*, 2001; Achard *et al.*, 2003). Es wurde postuliert, dass der Phänotyp der *sis1/ctr1-1* Mutanten durch das Fehlen der Ethylen-vermittelten Inhibition der GA-abhängigen Degradation der DELLA-Proteine GAI und RGA verursacht wird (Achard *et al.*, 2003).

Anhand der Experimente, die mit Pflanzen mit veränderter Ethylen-Antwort durchgeführt wurden, ist sowohl eine positive als auch eine negative Regulation des GA-Signals durch Ethylen möglich. Es wurde sowohl eine Induktions- wie auch Inhibitionswirkung von Ethylen auf das pflanzliche Wachstum beobachtet, was wahrscheinlich von der Ethylen-Dosis abhängig ist (zusammengefasst in Pierik *et al.*, 2006). Exogene Applikation von 350  $\mu\text{M}$  Ethephon (2-chloroethylphosphoniksäure, ein Ethylen-Vorläufer, der in Pflanzen infolge eines hydrolytischen Abbaus in Ethylen umgewandelt wird; (De Martinis und Mariani, 1999)) hat ein beschleunigtes Wachstum und starke Internodienverlängerung bei WT-Kartoffelpflanzen zur Folge, während die *StSUT4*-RNAi Kartoffeln kaum betroffen wurden (Daten von J. Liesche). Diese Ergebnisse könnten auf eine verringerte Ethylen-Sensitivität hinweisen. Zudem wurde gezeigt, dass es in transgenen *StSUT4*-RNAi Kartoffeln zur einer signifikanten Verminderung

der Transkriptakkumulation des Schlüsselenzyms der Ethylen-Biosynthese, der ACC Oxidase *StACO3*, kommt. Dies müsste eine verminderte Ethylen-Produktion zur Folge haben (Chincinska *et al.*, 2008). Aktuelle Untersuchungen in Hefezellen deuten auf eine direkte Interaktion von SUT4 mit einem Ethylenrezeptorprotein: in einer systematischen Suche nach Protein-Interaktionspartnern des StSUT4 mittels Split Ubiquitin System wurde eine Interaktion zwischen StSUT4 und dem Ethylenrezeptor ETR1 nachgewiesen (Reins, 2006). Diese Protein-Protein-Interaktion stellt eine mögliche Erklärung für die in *StSUT4*-RNAi-Pflanzen beobachteten Effekte dar. Auf eine Interaktion zwischen Ethylen-Antwort und SUT4 deutet auch die transkriptionale Regulation der *SUT4*-Expression nach Ethephon-Behandlung, die auf eine starke Induktion des *SUT4* durch Ethylen hinweist (Chincinska *et al.*, 2008).

Veränderungen in der Ethylen-Antwort von *StSUT4*-RNAi Kartoffeln könnten auch durch die Veränderungen im Kohlenhydratgehalt bzw. durch die früher postulierte (Kap.5.4.4) veränderte Saccharose-Sensitivität verursacht werden. Es ist bekannt, dass Veränderungen des Ethylen-Metabolismus und der Ethylen-Antwort mit Veränderungen der pflanzlichen Zucker-Sensitivität einhergehen können (Zhou *et al.*, 1998). Die *prl1* Mutante, die überempfindlich auf die Saccharose-abhängige Inhibierung der Keimlingsentwicklung reagiert, ist gleichzeitig auch hypersensitiv gegenüber Ethylen und anderen Phytohormonen wie Auxin, Abscisinsäure und Cytokinin (Gibson *et al.*, 2001).

### **5.5.3 Ist StSUT4 am GA-Signaling beteiligt?**

Anhand der gezeigten Daten kann man postulieren, dass SUT4 am GA-Signaling beteiligt ist. Dafür sprechen sowohl die Folgen der StSUT4-Inhibierung, die auf Veränderungen im GA-Metabolismus oder GA-Signaling hinweisen, als auch die Ergebnisse des Komplementationsversuchs durch GA<sub>3</sub>-Behandlung, die eine verminderte GA-Sensitivität suggerieren. Die beobachtete Steigerung der *SUT4*-Transkriptakkumulation nach GA<sub>3</sub>-Behandlung, sowie die Ergebnisse der Behandlung mit einem GA-Biosyntheseinhibitor, Paklobutrazol, unterstützen diese Theorie (Chincinska *et al.*, 2008).



Viele der ungeklärten Fragen liessen sich durch eine genaue Bestimmung des endogenen GA-Gehalts der *SUT4*-RNAi Pflanzen, sowie durch Analyse von DELLA-Proteinen klären. Wie kürzlich gezeigt, spielen die DELLA-Proteine nicht nur im GA-Signaling eine essentielle Rolle, sondern auch als Integratoren unterschiedlicher hormoneller Signalwege, sowie Phytochrom-abhängiger Signalwegen. In der Kartoffel ist ihre Funktion bislang nur wenig untersucht. Ihre Analyse in den *StSUT4*-RNAi-Pflanzen erscheint jedoch vielversprechend (Halliday, *et al.*, 2003; Haywood *et al.*, 2005; Rodríguez-Falcón, *et al.*, 2006; Djakovic-Petrovic *et al.*, 2007; Vandenbussche *et al.*, 2007; Lucas *et al.*, 2008).

## **5.6 *StSUT4*-RNAi Kartoffeln zeigen eine veränderte Antwort auf die qualitative und quantitative Lichtveränderungen**

Licht gehört zu den wichtigsten Umweltfaktoren, die über den Verlauf der pflanzlichen Entwicklung entscheiden. Sowohl Licht-Qualität als auch -Quantität können die pflanzliche Morphologie und Physiologie beeinflussen (Smith und Whitelam, 1997; Macháčkowá *et al.*, 1998; Kozuka *et al.*, 2005; Vandenbussche *et al.*, 2005). Die am stärksten durch die *StSUT4*-Inhibierung betroffenen physiologische Prozesse, also Wachstum, Blühverhalten und Knollenbildung, sind als stark Licht-regulierbar bekannt (Macháčkowá *et al.*, 1998; Martínez-García *et al.*, 2002a; Vandenbussche *et al.*, 2005; Lough und Lucas, 2006; Rodríguez-Falcón *et al.*, 2006; Lucas *et al.*, 2008). Wie unter anderem durch Pfropfexperimente gezeigt wurde, spielen *Source*-Blätter eine essentielle Rolle in der Licht-Perzeption und an der Umwandlung dieses Umwelt-Signals in physiologische Stimuli, die die Anpassung des pflanzlichen Organismus an die aktuellen Licht-Bedingungen ermöglichen (Martínez-García *et al.*, 2002a; Bernier und Périlleux, 2005; Lough und Lucas, 2006; Rodríguez-Falcón *et al.*, 2006). Pfropfexperimente der *StSUT4*-RNAi- mit WT-Kartoffeln haben gezeigt, dass es in den Pflanzen mit reduzierter *SUT4*-Expression zur Modifizierung eines in *Source*-Blättern generierten Phloem-mobilen übertragbaren Signals kommt, was zu beschleunigter Blüte und Knollenherstellung führt (Kap. 4.20).

Für die Licht-Perzeption in *Source*-Blättern und die Generierung eines Langstrecken-Signals sind Rezeptoren des hellroten (HR) und dunkelroten (DR) Lichts, also Phytochrome, und Blaulicht-Rezeptoren, Cryptochrome und Phototropine, verantwortlich (Gyula *et al.*, 2003; Vandebussche *et al.*, 2005; Jiao *et al.*, 2007; Franklin und Whitealm, 2005). Da die *StSUT4*-RNAi Pflanzen eine stark reduzierte Antwort auf die Bedingungen des veränderten HR:DR Verhältnisses zeigten (Abb. 32; Abb. 33), wird in Betracht gezogen, dass Phytochrome eine essentielle Rolle in der Entstehung des *StSUT4*-RNAi Phänotyps spielen können.

### **5.6.1 *StSUT4*-RNAi Kartoffeln zeigen eine veränderte Reaktion auf die Tageslänge**

Die Reduktion des endogenen GA-Gehalts, sowie der GA-Sensitivität sind nicht ausreichend, um die Reaktion der Pflanzen auf die Tageslänge zu ändern (Jackson und Prat, 1996; Jackson, 1999; Amador *et al.*, 2001; Rodríguez-Falcón *et al.*, 2006). Zur Knolleninduktion im LT kommt es bei den *StSUT4*-RNAi Andigena-Pflanzen 2-3 Monate früher (Kap. 4.22.1), als bei den Kartoffeln mit reduziertem GA-Gehalt (Jackson und Prat, 1996; Jackson, 1999; Rodríguez-Falcón *et al.*, 2006). Daraus könnte man schließen, dass die *StSUT4*-RNAi Kartoffeln insensitiv gegenüber der Tageslänge sind. In Hinsicht auf die Knollenbildung, die sogar unter nicht induktiven LT-Bedingungen möglich war, erinnern die *StSUT4*-Kartoffel an Antisense-*PhyB* Andigena-Pflanzen, in denen eine Aufhebung der Sensitivität gegenüber der Photoperiode festgestellt wurde (Jackson *et al.*, 1996).

Um die gestörte Antwort der Antisense -*PhyB* Andigena-Linien hinsichtlich der Tageslänge aufzuklären, wurde ein Gen *StCOL1* (*CONSTANS-like*) als molekularer Marker untersucht (Martínez-García *et al.*, 2002b). *StCOL1* zeigt eine deutliche photoperiodische Expression. Die *StCOL1*-Expression oszilliert im WT deutlich im KT, aber nur schwach im LT. Dagegen zeigt die *StCOL1*-Expression in den anti-*PhyB*-Andigena-Pflanzen eine deutliche Oszillation mit hoher Amplitude sowohl im KT, als auch im LT, also unabhängig von der Photoperiode. Das könnte indirekt auf eine Reduktion der photoperiodischen Sensitivität der anti-*PhyB*-Andigena-Pflanzen hinweisen (Martínez-García *et al.*, 2002b). Die *StCOL1*-Expression im Désirée WT zeigte eine mit den Literatur-Werten vergleichbare schwache Oszillation des mRNA-Gehalts (Martínez-García *et al.* 2002b; Abb. 45). In den *StSUT4*-RNAi Désirée-

Linien, insbesondere in der Linie 81, war die Amplitude zwischen der maximalen und minimalen *StCOL1*-Transkriptakkumulation im LT deutlich stärker als im WT (Abb. 45). Auch diesbezüglich ähneln die *StSUT4*-RNAi Pflanze den früher beschriebenen anti-*PhyB* Pflanzen. Womöglich ist eine reduzierte Sensitivität gegenüber der Photoperiode dafür verantwortlich.

Eine essentielle Rolle bei der Anpassung des pflanzlichen Tagesrhythmus an die Photoperiode spielt in Kartoffeln Phytochrom A (PHYA) (Yanovsky *et al.*, 2000). Für Kartoffelpflanzen, die *PhyA* überexprimieren, ist eine verspätete Knollenbildung, ein verringertes Wachstum und erhöhte Akkumulation von Anthocyanen und Chlorophyllen charakteristisch. In Kartoffelpflanzen mit reduzierter *PhyA*-Expression wurde ein gegensätzlicher Phänotyp beobachtet. Sowohl die Überexpression, als auch die Inhibition von *PhyA* führte dazu, dass die Pflanzen nicht mehr in der Lage waren, Veränderungen des HR:DR-Verhältnisses zu detektieren (Yanovsky *et al.*, 1998; Yanovsky *et al.*, 2000). Man weiß wenig über die Phytochrome-abhängige Kontrolle des Blühverhaltens in Kartoffel; in Arabidopsis jedoch wirkt PHYA positiv auf die photoperiodisch induzierte Blühinduktion (Guo *et al.*, 1998; Yanovsky und Kay, 2002; Mockler *et al.*, 2003).

Verschiedene der in den *StSUT4*-RNAi-Pflanzen beobachteten Effekte können auf eine mögliche Deregulation der PHYA-Funktionen infolge der *SUT4*-Inhibierung hinweisen. Es ist bekannt, dass der PHYA-Signalweg unter anderem durch Saccharose kontrolliert werden kann. In Arabidopsis-Keimlingen wurde beispielsweise eine negative Wirkung von Saccharose auf die durch DR-Licht (mit Beteiligung von PhyA) induzierten Entwicklungs-Veränderungen beobachtet (Dijkwel *et al.*, 1997). Möglich ist also, dass die in den *StSUT4*-RNAi-Pflanzen beobachteten Veränderungen im Kohlenhydratgehalt zur Deregulation einiger durch den PHYA-Signalweg kontrollierten pflanzlichen Prozessen führen (Kap. 4.6-4.10).

In den *StSUT4*-RNAi-Pflanzen wurden nur geringfügige Änderungen der *PhyA*-Expression beobachtet (Abb. 34). Daher müssten weiterführende Untersuchungen auf posttranskriptionaler Ebene erfolgen, um eine mögliche Beteiligung von PhyA an den Defekten der *StSUT4*-RNAi-Pflanzen aufzuklären.

## Gene des photoperiodischen Signalwegs der Blüh- und Knolleninduktion zeigen in den *StSUT4*-RNAi-Pflanzen eine veränderte Expression

Die mutmaßliche Deregulation der photoperiodischen Signaltransduktion in den Kartoffeln mit reduzierter *SUT4*-Expression wurde durch die Analyse ausgewählter Gene des durch die Photoperiode regulierten Blühinduktionswegs bestätigt (Kap. 4.19.2.) Wie vorher bereits postuliert, sind die Gene der photoperiodischen Blühinduktion auch an der photoperiodischen Induktion der Knollenbildung beteiligt (Martínez-García *et al.*, 2002b; Rodríguez-Falcón *et al.*, 2006).

Die in dieser Arbeit verwendeten WT Linien von *Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum* sowie *andigena* sind hinsichtlich der Blühinduktion strikt von einer LT-Photoperiode abhängig (Kap. 4.5.2; Kap. 4.22.2). *StSUT4*-RNAi Désirée sowie *StSUT4*-RNAi Andigena blühen im LT früher als die WT-Pflanzen. *SUT4* scheint also ein negativer Regulator der LT-abhängigen Blühinduktion zu sein. In *StSUT4*-RNAi Désirée wurde eine verringerte mRNA-Akkumulation der beiden bekannten Kartoffel-*COL*-Genen, *StCOL3* (Drobyszina und Khavkin, 2006), und *StCOL1* (Martínez-García *et al.*, 2002b), festgestellt (Abb. 45). Also geht die bei den *StSUT4*-RNAi-Pflanzen beobachtete beschleunigte Blüh- und Knolleninduktion mit einer verminderten Expression von *CO*-Homologen einher. Obwohl das Gen *CONSTANS* (*CO*) im LT in Arabidopsis als Blühinduktor wirkt und die *CO*-Überexpression frühzeitiges Blühen verursacht (Putterill *et al.*, 1995; Suarez-Lopez *et al.*, 2001; Yanovsky and Kay, 2002), können andere bekannten Gene der *COL(CONSTANS-like)*-Familie in Arabidopsis jedoch auch zur Blühinhibition führen (Cheng und Wang, 2005; Datta *et al.*, 2006). In Reis dagegen funktioniert das *CO*-homologe Hd1-Protein unter LT-Bedingungen als PHYB-induzierter Repressor von *Hd3a* (FT-Homolog) (Yano *et al.*, 2000; Ishikawa *et al.*, 2005; Kobayashi *et al.*, 2007; im Anhang).

In den Andigena-Pflanzen, die das *AtCO* überexprimieren, wurde eine verspätete Knollenbildung im KT sowie ein späteres Erblühen sowohl im LT, als auch im KT beobachtet (Martínez-García *et al.*, 2002b; González-Schain und Suárez-López, 2008). Obwohl die von González-Schain und Suárez-López 2008 verwendeten WT Andigena-Linien unabhängig von der

Photoperiode erblühten und die beschriebene Verspätung der Blühinduktion infolge der *At-CO*-Überexpression ebenfalls von der Photoperiode unabhängig war, kann man auf eine für die Blüte inhibierende Funktion des *CO*-Orthologs in Karotffeln schliessen. Dies stimmt mit der Beobachtung überein, dass die *COL*-Gene in den frühblühenden *StSUT4*-RNAi-Kartoffelpflanzen eine erniedrigte Transkriptmenge zeigen (Abb. 45).

*CO* aus Arabidopsis unterliegt einer komplexen Regulation, die sowohl transkriptionale, als auch post-transkriptionale Prozesse umfasst (Ahmad *et al.*, 1998; Jarillo *et al.*, 2001; Suarez-Lopez *et al.*, 2001; Yanovsky and Kay, 2002; Gyula *et al.*, 2003; Mockler *et al.* 2003; Valverde *et al.*, 2004; Ishikawa *et al.* 2005; Turck *et al.* 2008 Kobayashi *et al.* 2007). Da die *CO*-Regulation auf mehreren Ebenen stattfindet, geht die Veränderung der *CO*-Aktivität nicht immer mit einem veränderten mRNA-Gehalt einher (Wenkel *et al.*, 2006). Es wurde jedoch in Arabidopsis eine Korrelation der *CO*-Aktivität mit der Transkript-Akkumulation des *CO*-Targetgens, *FT*, nachgewiesen (Valverde *et al.*, 2004; Wenkel *et al.*, 2006). Die Aktivität des *CO*-Proteins kann deswegen indirekt durch die Analyse der mRNA-Akkumulation eines der *CO*-Targetgene überprüft werden (Valverde *et al.*, 2004). Die Orthologe der beiden Arabidopsis-Blühintegrator-Gene *FT* und *SOC1* (Samach *et al.* 2000; Bernier und Périlleux, 2005; Parcy, 2005; Wigge *et al.* 2005; Kobayashi *et al.* 2007) sind in Kartoffel bekannt, obwohl ihre Funktion bisher nicht eindeutig nachgewiesen wurde (Rodríguez-Falcón *et al.*, 2006). Veränderungen der Expression der beiden Blühintegrator-Gene wurden in den *StSUT4*-RNAi-Kartoffeln beobachtet (Abb. 45). Dies könnte auf eine veränderte Aktivität des CONSTANS-ähnlichen Proteins zurückzuführen sein.

In *StSUT4*-RNAi-*Source*-Blättern wurde eine während der gesamten LT-Periode erhöhte *FT*-mRNA Akkumulation festgestellt. Zu Beginn der LT-Lichtperiode wurde bei den *StSUT4*-RNAi-Pflanzen ein kurzfristiger steiler Anstieg des *FT*-mRNA-Gehalts festgestellt. Die *FT*-Expression im WT blieb dagegen während des ganzen Tages schwach und oszillierte kaum (Abb. 45). Der *CO*-abhängige Anstieg der *FT*-Transkription ist in Arabidopsis essentiell für die photoperiodische Blühinduktion, und der Expressionsrhythmus beider Gene stimmt im LT überein (Suarez-Lopez *et al.*, 2001). Da die maximale mRNA-Akkumulation von *StCOL3*, und von *StFT* zur gleichen Tageszeit auftritt, ist es wahrscheinlich, dass *StCOL3* für den Anstieg der *StFT*-mRNA-Akkumulation in den *StSUT4*-RNAi-Pflanzen verantwortlich ist.

*StCOL3* stellt vermutlich das *AtCO* orthologe Gen dar (Drobnyazina und Khavkin; 2006). Eine zweite Möglichkeit ist, dass für den bei den *StSUT4*-RNAi-Pflanzen beobachteten *FT*-Expressionsanstieg am Morgen die signifikant erniedrigte *StCOL3*-Expression in der Nacht verantwortlich ist (Abb. 45).

Da die Knollenbildung in der Kartoffel KT-abhängig und die Blütenbildung LT-abhängig ist, beide Prozesse jedoch unter Beteiligung derselben Gene erfolgen, kann man davon ausgehen, dass diese Gene unterschiedlich reguliert werden müssen. Für die Regulation der Knolleninduktion über die Photoperiode wurde ein Modell postuliert, das der genetischen Regulation der Blühinduktion in KT-Pflanzen sehr ähnelt (Rodríguez-Falcón *et al.*, 2006; Schema im Anhang). Demnach reprimiert *StCOL3* durch einen PHYB-abhängigen Mechanismus die *FT*-Expression unter LT-Bedingungen. Dagegen wirkt das *StCOL3*-Protein unter KT-Bedingungen als *FT*-Aktivator.

Im Gegensatz zu *StFT* zeigte *StSOC1* in den *StSUT4*-RNAi Pflanzen zu Beginn der LT-Lichtperiode reduzierte mRNA-Mengen (Abb. 45). Vermutlich ist die *SOC1*-Funktion in verschiedenen Pflanzen universell, da sowohl für *OsSOC1* im Reis, als auch für *AtSOC1* in Arabidopsis während der Blühinduktion eine Expressionssteigerung im Apex beobachtet wurde und eine konstitutive *OsSOC1*-Expression in Arabidopsis ein frühzeitiges Blühen verursacht (Tadege *et al.* 2003). Es ist bisher nicht klar, in welchen Pflanzenorganen (in Apex oder in Blättern) es zur CO-vermittelten *SOC1*-Aktivierung kommen könnte (Parcy, 2005). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Untersuchung der *StSOC1*-Expression in Kartoffel-*Source*-Blättern durchgeführt. Bei den *StSUT4*-RNAi Pflanzen wurde eine reduzierte mRNA-Akkumulation zu Beginn der LT-Lichtperiode festgestellt (Abb. 45). Es ist bekannt, dass die *SOC1*-Expression durch Gibberelline positiv reguliert ist (Borner *et al.*, 2000; Moon *et al.* 2003; Bernier und Périlleux, 2005; Corbesier und Coupland 2006; Liu *et al.*, 2008). Möglicherweise verursacht der postulierte verringerte Gehalt von endogenen GAs (Kap. 5.5) oder die reduzierte GA-Sensitivität der transgenen *StSUT4*-RNAi Pflanzen eine reduzierte *SOC1*-Transkriptakkumulation in *StSUT4*-RNAi *Source*-Blättern. *SOC1* scheint in Arabidopsis unter nicht-induktiven KT-Bedingungen von größerer Bedeutung zu sein, als unter induktiven Bedingungen (Moon *et al.* 2003; Liu *et al.*, 2008). Eine Expressionsanalyse von *SOC1* im Spross-Apex der *StSUT4*-RNAi Pflanzen wurde bislang noch nicht durchgeführt.

### 5.6.2 Die Schattenvermeidungsreaktion ist bei den *StSUT4*-RNAi Pflanzen reduziert

In der Natur geht die Beschattung von Pflanzen, beispielsweise durch die Blätter benachbarter Pflanzen mit einer Anreicherung des Infrarot-Anteils des Lichtes und dadurch mit einer Verringerung des HR:DR Verhältnisses einher (zur Übersicht: Franklin und Whitelam, 2005; Vandenbussche *et al.* 2005; Taiz und Zeiger, 2006). Beschattung kann experimentell entweder durch eine Pflanzenanzucht in hoher Dichte erreicht werden (Kap. 4.13.1) oder durch eine zusätzliche Infrarotlicht-Quelle (Kap. 4.13.3) simuliert werden. Die *StSUT4*-RNAi-Kartoffeln zeigten unter diesen Bedingungen, sowohl bei Beschattung durch benachbarte Pflanzen, als auch durch eine zusätzliche DR-Quelle eine im Vergleich zum WT reduzierte Antwort auf die Änderung des HR:DR-Verhältnisses.

Für die Steuerung der physiologischen Antwort der Pflanze auf die Beschattung und die Perception des veränderten HR:DR-Verhältnisses sind Phytochrome, insbesondere PHYB verantwortlich (Smith und Whitelam, 1997; Bernier und Périlleux, 2005; Franklin und Whitelam, 2005; Vandenbussche *et al.* 2005). Die *phyB*-defizienten Mutanten vieler Pflanzenarten zeigen eine konstitutive Schattenvermeidungsreaktion sogar im weissen Licht. Sie besitzen verlängerte Sprossachsen und Petiolen, reduzierte Blattflächen, einen verringerten Chlorophyllgehalt und blühen früher (Reed *et al.*, 1993; Mockler *et al.* 2003; Franklin und Whitelam, 2005). Wie bereits erwähnt sind die anti-*PhyB* Andigena Kartoffeln zudem auch unter nicht-induktiven LT-Bedingungen zur Knollenproduktion fähig (Jackson *et al.* 1996). Hinsichtlich ihrer Fähigkeit, auch unter nicht-induktiven LT-Bedingungen Knollen zu bilden, sowie des frühblühenden Phänotyps erinnern die *StSUT4*-RNAi Kartoffeln an Pflanzen mit einem Defekt der PHYB-Funktion. Auch die Tendenz der *StSUT4*-RNAi Kartoffeln zu verringerten Gehalten verschiedener Carotinoide könnte auf eine verminderte PHYB-Aktivität hinweisen (Abb. 35; Welsch *et al.*, 2000; von Lintig *et al.*, 1997). Die Analyse der *phyB*-Expression im LT zeigte jedoch eine erhöhte *PhyB*-mRNA-Akkumulation in *StSUT4*-RNAi Blättern in der ersten Tageshälfte (Abb. 34). Durch erhöhte PHYB-Aktivität könnte man die verkürzten Internodien und das verringerte Sprosswachstum der *StSUT4*-RNAi Kartoffeln erklären. Für die *phyB*-Mutante ist dagegen ein gesteigertes Sprosswachstum charakteristisch (Reed *et al.*, 1993; Jackson *et al.* 1996; Mockler *et al.* 2003; Franklin und Whitelam, 2005). Interessanterweise wurde gezeigt, dass es unter Beschattung zu einer erhöhten *SUT4*-mRNA-

Akkumulation kommt (Abb. 31). Es wurde auch nachgewiesen, dass der Schatten-abhängige Anstieg der *SUT4*-Expression durch ein reduziertes HR:DR Verhältnis verursacht wird (Chincinska *et al.*, 2008). Eine Steigerung der *SUT4*-Expression bei verringertem HR:DR-Verhältnis konnte allerdings in *PhyB*-Antisense-Pflanzen nicht beobachtet werden (Johannes Liesche, nicht publizierte Daten). Dies legt nahe, dass *SUT4* tatsächlich *PhyB*-abhängig reguliert wird, und dass *SUT4* womöglich essentiell ist für die *PhyB*-abhängige Antwort der Pflanzen auf Beschattung.

Die Komponenten der photoperiodischen Blühinduktion sind in Arabidopsis auch an der Genese der Schattenvermeidungsreaktion beteiligt (Johnson *et al.*, 2008). In Arabidopsis-Pflanzen kommt es im LT bei verringertem HR:DR-Verhältnis zu einem CO-vermittelten Anstieg der *FT*-mRNA-Akkumulation (Johnson *et al.*, 2008). Zusätzlich zu dem für LT-Bedingungen charakteristischen Maximum der *FT*-Transkriptakkumulation gegen Ende der Lichtperiode (Suarez-Lopez *et al.*, 2001) wurde in Arabidopsis bei einem niedrigen HR:DR-Verhältnis ein zusätzlicher *Peak* zu Beginn der Lichtperiode beobachtet (Johnson *et al.* 2008). Interessanterweise wurde auch im Fall der *StSUT4*-RNAi-Kartoffeln ein Anstieg des *FT*-mRNA-Gehalts, insbesondere in den frühen Morgenstunden beobachtet (Abb. 45). Eine Reduktion der *SUT4*-Expression führt demnach zur Deregulation der Gene, die die Antwort auf ein verändertes HR:DR-Verhältnis steuern.

Anhand der oben dargestellten Daten kann man postulieren, dass *SUT4* als negativer Regulator der Blüh- und Knolleninduktion *downstream* des *PHYB*-abhängigen Signalweges wirkt, da *SUT4* anscheinend durch *PhyB* reguliert wird. Die Tatsache, dass der *PhyB*-Transkriptgehalt in *StSUT4*-RNAi-Pflanzen erhöht ist, spricht für eine *feed back* Regulation von *PhyB* durch *SUT4*. *PhyB* scheint für die Infrarotlicht-abhängige Induktion von *SUT4* benötigt zu werden, andererseits scheint die *SUT4*-abhängige Ausprägung eines Schattenvermeidungssyndroms wichtig, um den *PhyB*-Transkriptgehalt gering zu halten.



Änderungen der hormonellen Antwort, sowie der phytochrom-abhängigen Antwort könnten gemeinsam für die Verringerung der Schattenvermeidungsreaktion in *StSUT4*-RNAi-Pflanzen verantwortlich sein

An der Generierung der Schattenvermeidungsreaktion sind nicht nur die Phytochrome, sondern auch Blaulichtrezeptoren, Zucker, Phytohormone wie Gibberelline, Ethylen und Auxin, sowie Elemente der inneren Uhr beteiligt (López-Juez *et al.*, 1995; Halliday and Fankhauser, 2003; Pierik *et al.* 2004a; Kozuka *et al.* 2005; Vandenbussche *et al.* 2005). Da GAs für die Generierung der Schattenvermeidungsreaktion essentiell sind (Halliday and Fankhauser, 2003; López-Juez *et al.*, 1995; Pierik *et al.*, 2004a), könnte die verringerte Reaktion der *StSUT4*-RNAi Pflanzen auf Beschattung auf einem verringerten Gehalt endogener GAs bzw. auf einer verringerten GA-Sensitivität beruhen. In *Arabidopsis* verursacht ein niedriges HR:DR-Verhältnis eine vermehrte GA-Biosynthese und gesteigertes GA-Signaling (Reed *et al.*, 1996; Devlin *et al.*, 2003; Hisamatsu *et al.*, 2005). Paklobutrazol-Behandlung verursacht in *Arabidopsis* eine verringerte Reaktion auf ein vermindertes HR:DR-Verhältnis. Sowohl im Fall der GA-defekten *gal-3* Mutante, wie auch im Fall der GA-insensitiven *gai* Mutante wurde ebenfalls eine reduzierte Reaktion auf Änderungen des HR:DR Verhältnisses beobachtet (Peng and Harberd, 1997). Die Antwort auf DR-Anreicherung ist in der *gai* Mutante allerdings nicht vollständig unterdrückt, da wahrscheinlich andere DELLA-Proteine wie RGA den GAI-Defekt teilweise kompensieren. Gesteigerte DELLA-Protein-Stabilität scheint die HR:DR-Antwort zu inhibieren (Djakovic-Petrovic *et al.*, 2007).

PHYB kann GA-Biosynthese und -Sensitivität negativ beeinflussen (Kamiya und García-Martínez, 1999). Es wurde z.B. gezeigt, dass das verstärkte Internodienwachstum von *Anti-PhyB* Andigena (Jackson *et al.*, 1996) durch einen erhöhten Gibberellin A<sub>1</sub>-Gehalt im Stängel verursacht wurde (Kamiya und García-Martínez, 1999; Rodríguez-Falcón *et al.*, 2006). Die konstitutive Schattenvermeidungsreaktion von *Arabidopsis PhyB* Mutanten kann durch Inaktivierung des GA-Biosynthese-Gens *GAI* aufgehoben werden (Peng und Harberd, 1997). Es ist auch bekannt, dass es in *phyB*-Mutanten zu Expressionsveränderungen von Genen kommt, die am Ethylen-Metabolismus beteiligt sind und es infolgedessen zu einer Ethylen-Überproduktion kommt (Finlayson *et al.*, 1998; Vandenbussche *et al.*, 2003; Pierik *et al.*, 2004a; Vandenbussche *et al.*, 2005). Es wurde gezeigt, dass Ethylen für die Generierung von

Schattenvermeidungsreaktion essentiell ist. Transgene Tabakpflanzen, die Ethylen-insensitiv sind, zeigen eine reduzierte Antwort auf das erniedrigte HR:DR-Verhältnis (Pierik *et al.*, 2004b). Es wurde nachgewiesen, dass die bei Beschattung Ethylen-induzierte Sprossverlängerung GA-abhängig war (Pierik *et al.*, 2004a).

Mögliche Veränderungen im GA- und Ethylen-Metabolismus oder -Signaling der *StSUT4*-RNAi Kartoffeln wurden bereits diskutiert (Kap. 5.5.2). Die teilweise Aufhebung der Schattenvermeidungsreaktion, die normalerweise durch mehrere genetische Signalübertragungswegen reguliert wird, könnte auf eine integrative Funktion des SUT4 hinweisen (Abb. 53).

## **5.7 SUT4 als Integrator von Signalübertragungswegen, die die pflanzliche Antwort auf Licht, Hormone und Zucker regulieren?**

Die oben dargestellten Daten weisen auf eine integrative Rolle des SUT4, der pflanzliche Antwortwege auf Licht-, Hormon- und Zucker-Signale verbindet und zur Anpassung der pflanzlichen Physiologie auf veränderte Umweltbedingungen durch Generierung der Schattenvermeidungsreaktion, sowie Regulation der Blühinduktion und Knollenbildung führt. Anhand von Literaturdaten und der während der vorliegenden Arbeit gewonnenen Ergebnisse, sowie weiterer Ergebnisse der AG Kühn wurde ein Modell der möglichen SUT4-Interaktion mit verschiedenen Signalübertragungswegen erstellt (Abb. 53; Chincinska *et al.*, 2008).

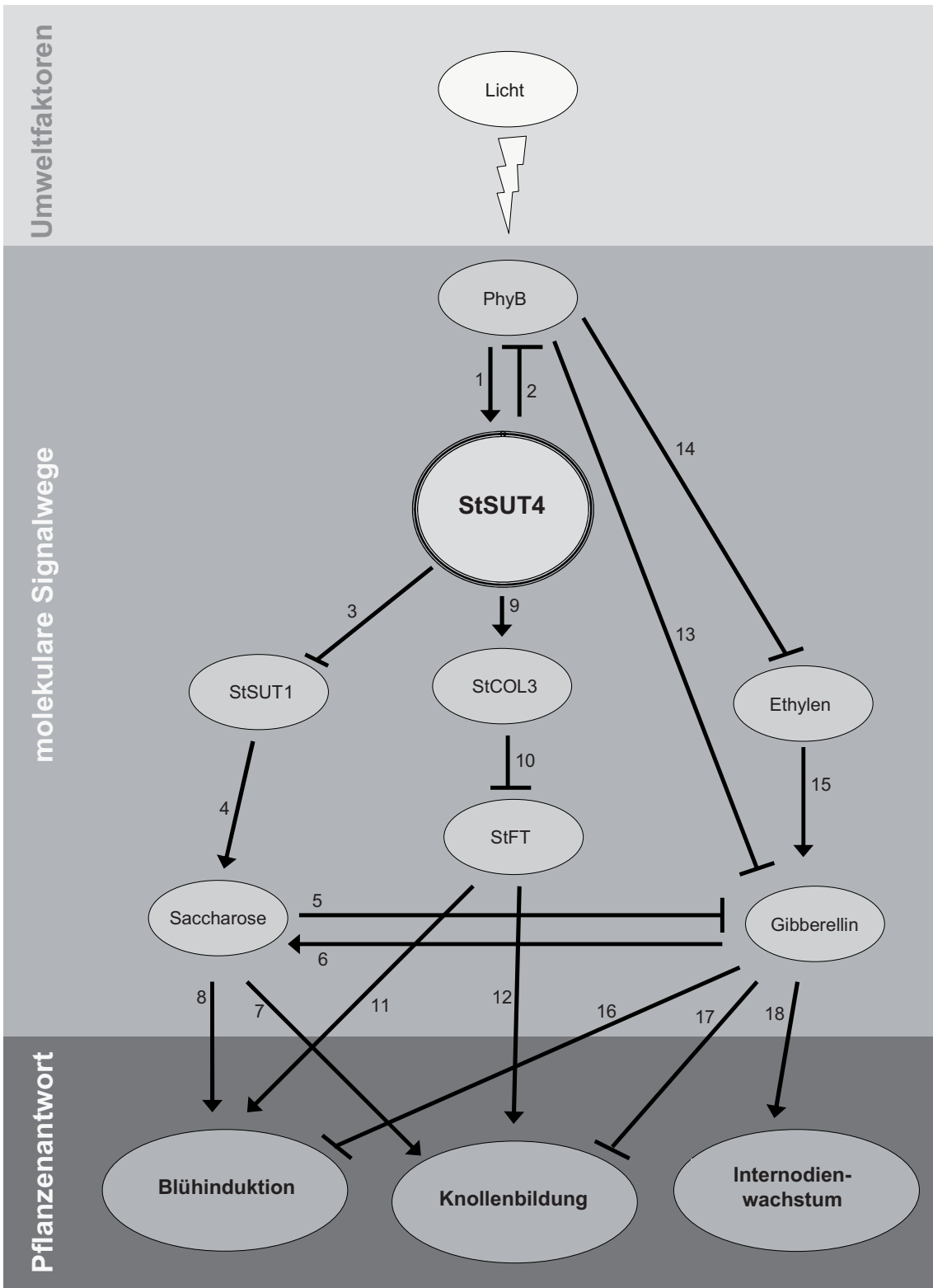


Abb. 53: Modell der möglichen SUT4-Interaktion mit verschiedenen Signalübertragungswegen. Nach Chincinska *et al.*, 2008 verändert. Das Modell wurde anhand folgenden Daten erstellt: **1)** unpublizierte Daten von AG Kühn (anhand der Analysen von *anti-PhyB* Kartoffelpflanzen), Kap. 5.6.2; **2)** Abb. 34; **3)** Kap. 5.4.2; **4)** Riesmeier *et al.*, 1994; Kühn *et al.*, 1996; Bürkle *et al.*, 1998; **5)** Dielen *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 1998a; Abb. 16, Abb. 17, Abb. 26, **6)** Rodríguez-Falcón *et al.*, 2006; Kap 5.5.1, **7)** Müller-Rober *et al.*, 1992; Xu *et al.*, 1998a; Jackson, 1999; Rodríguez-Falcón *et al.*, 2006; Abb. 16, Abb. 17, **8)** Corbesier *et al.*, 1998; Roldán *et al.*, 1999; Bernier und Périlleux, 2005; Eriksson *et al.*, 2006; Abb. 44, **9)** Abb. 45, **10)** Rodríguez-Falcón *et al.*, 2006; Abb. 45, **11)** Rodríguez-Falcón *et al.*, 2006; **12)** Rodríguez-Falcón *et al.*, 2006; **13)** Peng und Harberd, 1997; Kamiya und García-Martínez, 1999; Rodríguez-Falcón *et al.*, 2006; **14)** Finlayson *et al.*, 1998; Vandenbussche *et al.*, 2003; Pierik *et al.*, 2004a; Vandenbussche *et al.*, 2005; **15)** Pierik *et al.*, 2004a; **16)** Dielen *et al.*, 2001; King und Ben-Tal, 2001; Abb. 24, Kap. 5.5, **17)** Rodríguez-Falcón *et al.*, 2006; Abb. 25, **18)** Macháčkowá *et al.*, 1998; Martínez-García *et al.*, 2002a Rodríguez-Falcón *et al.*, 2006; Abb. 22, Abb. 23, Abb. 26, Kap. 5.5

## Literatur

Abe M., Kobayashi Y., Yamamoto S., Daimon Y., Yamaguchi A., Ikeda Y., Ichinoki H., Nohguchi M., Goto K. and Araki T. (2005) FD, a bZIP protein mediating signals from the floral pathway integrator FT at the shoot apex. *Science* 309: 1052-1056

Achard P., Cheng H., De Grauwe L., Decat J., Schoutteten H., Moritz T., Van Der Straeten D., Peng J., Harberd N.P. (2006) Integration of plant responses to environmentally activated phytohormonal signals. *Science* 311: 91-94

Achard P., Liao L., Jiang C., Desnos T., Bartlett J., Fu X., Harberd N.P. (2007) DELLAs Contribute to Plant Photomorphogenesis. *Plant Physiology*. 143: 1163–1172

Achard P., Vriezen W.H., Van Der Straeten D., Harberd N. P. (2003) Ethylene regulates Arabidopsis development via the modulation of DELLA protein growth repressor function. *The Plant Cell* 15: 2816–2825

Ahmad M., Cashmore A. (1993) HY4 gene of *A.thaliana* encodes a protein with characteristics of a blue-light photoreceptor. *Nature* 399: 162-166

Ahmad M., Jarillo J.A., Smirnova O., Cashmore A.R. (1998) The CRY1 blue light photoreceptor of Arabidopsis interacts with phytochrome A in vitro. *Molecular Cell* 1: 939-948

Alabadi D., Oyama T., Yanovsky M.J., Harmon F.G., Más P., Kay S.A. (2001) Reciprocal regulation between TOC1 and LHY/CCA1 within the Arabidopsis circadian clock. *Science* 293: 880-883

Almekinders C.J.M., Struik P.C. (1996) Shootdevelopment and flowering in potato (*Solanum tuberosum* L.). *Potato research* 39: 581-607

Alvey L., Harberd N.P. (2005) DELLA proteins: integrators of multiple plant growth regulatory inputs? *Physiologia Plantarum* 123: 153–160

Amador V., Monte E., García-Martínez J.-L., Prat S. (2001) Gibberellins signal nuclear import of PHOR1, a photoperiod-responsive protein with homology to *Drosophila armadillo*. *Cell* 106: 343-354

An H., Roussot C., Suárez-López P., Corbesier L., Vincent C., Piñeiro M., Hepworth S., Mouradov A., Justin S., Turnbull C., Coupland. G. (2004) CONSTANS acts in the phloem to regulate a systemic signal that induces photoperiodic flowering of Arabidopsis. *Development* 131: 3615-3626

Ayre B.G., Turgeon R. (2004) Graft Transmission of a Floral Stimulant Derived from CONSTANS. *Plant Physiology* 135: 2271-2278

Ballaré C.L. (1999) Keeping up with the neighbours: phytochrome sensing and other signaling mechanisms. *Trends in Plant Science* 4: 97-102

Barker L., Kühn C., Weise A., Schulz A., Gebhardt C., Hirner B., Hellmann H., Schulze W., Ward J.M., Frommer W.B. (2000) SUT2, a Putative Sucrose Sensor in Sieve Elements. *The Plant Cell* 12: 1153–1164

Bernier G., Havelange A., Houssa C., Petitjean A., Lejeunde P. (1993) Physiological signals that induce flowering. *The Plant Cell* 5: 1147-1155

Bernier G., Périlleux C. (2005) A physiological overview of the genetics of flowering time control. *Plant Biotechnology Journal* 3: 3-16

Bläsing O.E., Gibon Y., Günther M., Höhne M., Morcuende R., Osuna D., Thimm O., Usadel B., Scheibe W-R., Stitt M. (2005) Sugars and circadian regulation make major contributions to the global regulation of diurnal gene expression in Arabidopsis. *The Plant Cell* 17: 3257-3281

Blázquez M.A., Greek R., Nilsson O., Sussman M.R., Weigel D. (1998) Gibberellins promote flowering of Arabidopsis by activating the LEAFY promoter. *The Plant Cell* 10: 791-800

Blázquez M.A., Weigel D. (2000) Integration of floral inductive signals in Arabidopsis. *Nature* 404: 889–892

Blázquez M., Soowal L., Lee I., Weigel,D. (1997) LEAFY expression and flower initiation in Arabidopsis. *Development* 124: 3835–3844

- Boldt K., Haupt B., Chincinska I.A., Pörs Y., Kühn C., Grimm B., Franken P. (2009) Carbon assimilation and sucrose transport in tomato arbuscular mycorrhiza. (will be submitted to *Plant, Cell and Environment*)
- Bologa K.L., Fernie A.R., Leisse A., Ehlers Loureiro M., Geigenberger P. (2003) A bypass of sucrose synthase leads to low internal oxygen and impaired metabolic performance in growing potato tubers. *Plant Physiology* 132: 2058–2072
- Boorer K.J., Loo D.D.F., Frommer W.B., Wright E.M. (1996) Transport mechanism of the cloned potato H<sup>+</sup>/sucrose cotransporter StSUT1. *The Journal of Biological Biochemistry* 271: 25139–25144
- Borner R., Kampmann G., Chandler J., Gleißner R., Wisman E., Apel K., Melzer S. (2000) A MADS domain gene involved in the transition to flowering in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 24: 581-599
- Boss P.K., Bastow R.M., Mylne J S., Dean C. (2004) Multiple pathways in the decision to flower: enabling, promoting, and resetting. *The Plant Cell* 16: S18-S31
- Briggs W. R, Spudich J. L. (2005) *Handbook of photosensory receptors* WILLEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, ISBN 3-527-31019-3
- Bürkle L., Hibberd J.M., Quick W.P., Kühn C., Hirner B., Frommer W.B. (1998) The H<sup>+</sup>-sucrose cotransporter NtSUT1 is essential for sugar export from tobacco leaves. *Plant Physiology* 118: 59–68



- Carpaneto A., Geiger D., Bamberg E., Sauer N., Fromm J., Hedrich R. (2005) Phloem-localized, proton-coupled sucrose carrier ZmSUT1 mediates sucrose efflux under the control of the sucrose gradient and the proton motive force. *The Journal of Biological Chemistry* 280: 21437–21443
- Carrera E., Bou J., Garcia-Martinez J.L., Prat S. (2000) Changes in GA 20-oxidase gene expression strongly affect stem length, tuber induction and tuber yield of potato plants. *The Plant Journal* 22: 247-256
- Carrera E., Jackson S.D., Prat S. (1999) Feedback control and diurnal regulation of gibberellin 20-oxidase transcript levels in potato. *Plant Physiology* 119: 765-773
- Casal J.J. (1996) Phytochrome a enhances the promotion of hypocotyls growth caused by reductions in levels of phytochrome B in its far-red-light-absorbing form in light-grown *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* 11: 965-973
- Cerdán P.D., Chory J. (2003) Regulation of flowering time by light quality. *Nature* 423: 881-885
- Chen M.-J., Yuan Z., Huang H. (2006) DELAYED FLOWERING, an Arabidopsis gene that acts in the autonomous flowering promotion pathway and is required for normal development. *Journal of Integrative Plant Biology* 48: 27–34
- Cheng W.-H., Endo A., Zhou L., Penney J., Chen H.-C., Arroyo A., Leon P., Nambara E., Asami T., Seo M., Koshiba T., Sheen J. (2002) A unique short-chain dehydrogenase/

reductase in Arabidopsis glucose signaling and abscisic acid biosynthesis and functions. *The Plant Cell* 14: 2723–2743

Cheng X.-F., Wang Z.-Y. (2005) Overexpression of COL9, a CONSTANS-LIKE gene, delays flowering by reducing expression of CO and FT in Arabidopsis thaliana. *The Plant Journal* 43: 758–768

Chincinska I.A., Liesche J., Krügel U., Michalska J., Geigenberger P., Grimm B., Kühn C. (2008) Sucrose transporter StSUT4 from potato affects flowering, tuberization, and shade avoidance response. *Plant Physiology* 146: 515–528

Chiou T.-J., Bush D.R. (1998) Sucrose is a signal molecule in assimilate partitioning. *Plant Biology* 95: 4784–4788

Corbesier L., Coupland G. (2006) The quest for florigen: a review of recent progress. *Journal of Experimental Botany* 57: 3395-3404

Corbesier L., Kustermans G., Périlleux C., Melzer S., Moritz T., Havelange A., Bernier G. (2004) Gibberellins and the floral transition in *Sinapis alba*. *Physiologia Plantarum* 122: 152-158

Corbesier L., Lejeune P., Bernier G. (1998) The role of carbohydrates in the induction of flowering in Arabidopsis thaliana: comparison between the wild type and starchless mutant. *Planta* 206: 131-137

- Corbesier L., Vincent C., Jang S., Fornara F., Fan Q., Searle I., Giakountis A., Farrona S., Gissot L., Turnbull C., Coupland G. (2007) FT protein movement contributes to long-distance signaling in floral induction of Arabidopsis. *Science* 316: 1030-1033
- Datta S., Hettiarachchi G.H., Deng X.W., Holm M. (2006) Arabidopsis CONSTANS-LIKE3 is a positive regulator of redlight signaling and root growth. *The Plant Cell* 18: 70-84
- David K.M., Armbruster U., Tama N., Putterill J. (2006) Arabidopsis GIGANTEA protein is post-transcriptionally regulated by light and dark. *FEBS Letters* 580: 1193–1197
- De Martinis D., Mariani C. (1999) Silencing gene expression of the ethylene-forming enzyme results in a reversible inhibition of ovule development in transgenic tobacco plants. *The Plant Cell* 11: 1061–1071
- Deblaere R., Bytebier B., De Greve H., Deboeck F., Schell J., Van Montagu M., Leemans J. (1985) Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for Agrobacterium-mediated gene transfer to plants. *Nucleic Acids Research* 13: 4777-4788
- Delrot S. (1981) Proton fluxes associated with sugar uptake in *Vicia faba* leaf tissues. *Plant Physiology* 68: 706-711
- Delrot S., Bonnemain J.-L. (1981) Involvement of protons as a substrate for the sucrose carrier during phloem loading in *Vicia faba* leaves. *Plant Physiology* 67: 560-564

- Devlin P.F., Yanovsky M.J., Kay S.A. (2003) A genomic analysis of the shade avoidance response in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 133: 1617–1629
- DeWitt N.D., Sussman M.R. (1995) Immunocytological localization of an epitope-tagged plasma membrane proton pump (H<sup>+</sup>)-ATPase) in phloem companion cells. *The Plant Cell* 7: 2053-2067
- Dielen V., Lecouvet V., Dupont S., Kinet J.-M. (2001) In vitro control of floral transition in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.), the model for autonomously flowering plants, using the late flowering uniflora mutant. *Journal of Experimental Botany* 52: 715-723
- Dijkwel P.P., Huijser C., Weisbeek P.J., Chua N.-H., Smeekeens S.C.M. (1997) Sucrose control of phytochrome A signaling in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 9: 583-595
- Dill A., Sun T.-p. (2001) Synergistic derepression of gibberellin signaling by removing RGA and GAI function in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 159: 777–785
- Ding Z., Doyle M.R., Amasino R.M., Davis S.J. (2007) A Complex genetic interaction between *Arabidopsis thaliana* TOC1 and CCA1/LHY in driving the circadian clock and in output regulation. *Genetics* 176: 1501-1510
- Djakovic-Petrovic T., de Wit M., Voeseek L.A.C.J., Pierik R. (2007) DELLA protein function in growth responses to canopy signals. *The Plant Journal* 51: 117–126

- Doering-Saad C., Newbury H.J., Bale J.S., Pritchard J. (2002) Use of aphid stylectomy and RT-PCR for the detection of transporter mRNA in sieve elements. *Journal of Experimental Botany* 53: 631-637
- Drobyazina P.E., Khavkin E.E. (2006) A structural homolog of CONSTANS in potato. *Russian Journal of Plant Physiology* 53: 398-701
- El-Assal S. E.-D., Alonso-Blanco C., Peeters A.J.M., Wegemaker C., Weller J.L., Koornneef M. (2003) The role of cryptochrome2 in flowering in Arabidopsis. *Plant Physiology* 133: 1504-1516
- Endler A., Meyer S., Schelbert S., Schneider T., Weschke W., Peters S. W., Keller F., Baginsky S., Martinoia E., Schmidt U.G. (2006) Identification of a vacuolar sucrose transporter in barley and Arabidopsis mesophyll cells by a tonoplast proteomic approach. *Plant Physiology* 141: 196–207
- Endo M., Nakamura S., Araki T., Mochizuki N., Nagadani A. (2005) Phytochrome B in the mesophyll delays flowering by suppressing FLOWERING LOCUS T expression in Arabidopsis vascular bundles. *The Plant Cell* 17: 1941-1952
- Eriksson S., Böhlenius H., Moritz T., Nilsson O. (2006) GA4 is the active gibberellin in the regulation of LEAFY transcription and Arabidopsis floral initiation. *The Plant Cell* 18: 2172–2181
- Fernie A.R., Willmitzer L. (2001) Molecular and biochemical triggers of potato tuber development. *Plant Physiology* 127: 1459–1465

- Fleck B., Harberd N.P. (2002) Evidence that the Arabidopsis nuclear gibberellin signaling protein GAI is not destabilised by gibberellin. *The Plant Journal* 32: 935–947
- Fleet C.M., Sun T. (2005) A DELLAcate balance: the role of gibberellin in plant morphogenesis. *Current Opinion in Plant Biology* 8: 77–85
- Fleige S., Pfaffl M.W. (2007) Einfluss der RNA-Integrität auf die quantitative real-time RT-PCR. *Laborwelt* 5: 4-8
- Flemetakis E., Dimou M., Cotzur D., Efroze R.C., Aivalakis G., Colebatch G., Udvardi M., Katinakis P. (2003) A sucrose transporter, LjSUT4, is up-regulated during Lotus japonicus nodule development. *Journal of Experimental Botany* 54: 1789-1791
- Fliege R., Flügge U.I, Werdan K., Heldt H.W. (1978) Specific transport of inorganic phosphate, 3-phosphoglycerate and triosephosphates across the inner membrane of the envelope in spinach chloroplasts. *Biochimica et Biophysica* 502: 232-237
- Foster T.M., Lough T.J., Emerson S.J., Lee R.H., Bowman J.L., Forster R.L.S., Lucas W.J. (2002) A surveillance system regulates selective entry of RNA into the shoot apex. *The Plant Cell* 14: 1497–1508
- 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: 4679-4688

- Franklin K.A., Whitelam G.C. (2005) Phytochromes and shade-avoidance responses in plants. *Annals of Botany* 96: 169–175
- Fu X., Harberd N.P. (2003) Auxin promotes *Arabidopsis* root growth by modulating gibberellin response. *Nature* 421: 740-743
- Gamalei Y.V. (1989) Structure and function of leaf minor veins in trees and herbs. *Trees* 3: 96–110
- Gamalei Y.V. (1991) Phloem loading and its development related to plant evolution from trees to herbs. *Trees* 5: 50–64
- Geigenberger P., Stitt M. (1993) Sucrose synthase catalyses a readily reversible reaction in developing potato tubers and other plant tissues. *Planta* 189: 329–339
- Geigenberger P. (2003) Regulation of sucrose to starch conversion in growing potato tubers. *Journal of Experimental Botany* 54: 457-465
- Geigenberger P., Kolbe A., Tiesse A. (2005) Redox regulation of carbon storage and partitioning in response to light and sugars. *Journal of Experimental Botany* 416: 1469–1479
- Giaquinta R. (1977) Phloem loading of sucrose: pH dependence and selectivity. *Plant Physiology* 59: 750-755

Gibson S.I. (2004) Sugar and phytohormone response pathway: navigating a signaling network. *Journal of Experimental Botany* 55: 253-264

Gibson S.I. (2005) Control of plant development and gene expression by sugar signalling. *Current Opinion in Plant Biology* 8: 93-102

Gibson S.I. Graham I.A. (1999) Another player joins the complex field of sugar-regulated gene expression in plants. *PNAS* 96: 4746–4748

Gibson S.I., Laby R.J., Kim D. (2001) The sugar-insensitive1 (*sis1*) mutant of *Arabidopsis* is allelic to *ctrl*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 280: 196–203

Gisel A., Hempel F.D., Barella S., Zambryski P. (2002) Leaf-to-shoot apex movement of symplastic tracer is restricted coincident with flowering in *Arabidopsis*. *PNAS* 99: 1713-1717

González-Schain N.D., Suárez-López P. (2008) *CONSTANS* delays flowering and affects tuber yield in potato. *Biologia Plantarum* 52: 251-258

Goto N., Kumagai T., Korneef M. (1991) Flowering responses to light-breaks in photomorphogenic mutants of *Arabidopsis thaliana*, along-day plant. *Physiologia Plantarum* 83: 209-215



- Gottwald J.R., Krysan P.J., Young J.C., Evert R.F., Sussman M.R. (2000) Genetic evidence for the in planta role of phloem-specific plasma membrane sucrose transporters. *PNAS* 97: 13979–13984
- Guo H., Yang H., Mockler T. C., Lin C. (1998) Regulation of flowering time by Arabidopsis photoreceptors. *Science* 179: 1360-1363
- Gyula P., Schäfer E., Nagy F. (2003) Light perception and signalling in higher plants. *Current Opinion in Plant Biology* 6: 446–452
- Hackel A., Schauer N., Carrari F., Fernie A.R., Grimm B., Kühn C. (2006) Sucrose transporter LeSUT1 and LeSUT2 inhibition affects tomato fruit development in different ways. *The Plant Journal* 45: 180–192
- Halliday K.J., Fankhauser C. (2003) Phytochrome-hormonal signaling networks. *New Phytologist* 157: 449–463
- Haritatos E., Medville R., Turgeon R. (2000) Minor vein structure and transport in Arabidopsis thaliana. *Planta* 211: 105-111
- Harmer S.L., Hogenesch J.B., Straume M., Chang H.-S., Han B., Zhu T., Wang X., Kreps J.A., Kay S.A. (2000) Orchestrated transcription of key pathways in Arabidopsis by the circadian clock. *Science* 290: 2110-2113

- Harmer S.L., Kay S.A. (2005) Positive and negative factors confer phase-specific circadian regulation of transcription in Arabidopsis. *The Plant Cell* 17: 1926- 1940
- Harms K., Wöhner R. W., Schulz B., Frommer W.B. (1994) Isolation and characterization of P-type H(+)-ATPase genes from potato. *Plant Molecular Biology* 26: 979-88
- Havelange A., Lejeune P., Bernier G. (2001) Sucrose/cytokinin interaction in *Sinapis alba* at floral induction: a shoot-to-root-to-shoot physiological loop. *Physiologia Plantarum* 109: 343–350
- Hayama R., Agashe B., Luley E., King R., Coupland G. (2007) A circadian rhythm set by dusk determines the expression of FT homologs and the short-day photoperiodic flowering response in *Pharbitis*. *The Plant Cell* 19: 2988–3000
- Hayama R., Coupland G. (2004) The molecular basis of diversity in the photoperiodic flowering responses of Arabidopsis and rice. *Plant Physiology* 135: 677-684
- Hayama R., Yokoi S., Tamaki S., Yano M., Shimamoto K. (2003) Adaptation of photoperiodic control pathways produces short-day flowering in rice. *Nature* 422: 719-722
- Haywood V., Yu T.-S., Huang N.-C., Lucas W.J. (2005) Phloem long-distance trafficking of GIBBERELLIC ACID-INSENSITIVE RNA regulates leaf development. *The Plant Journal* 42: 49–68

- He H., Chincinska I., Hackel A., Grimm B., Kühn C. (2008) Phloem mobility and stability of sucrose transporter transcripts. *The Open Plant Science Journal* 2: 1-14
- Hendriks J.H.M., Kolbe A., Gibon Y., Stitt M., Geigenberger P. (2003) ADP-glucose pyrophosphorylase is activated by post-translational redox-modification in response to light and to sugars in leaves of *Arabidopsis* and other plant species. *Plant Physiology* 133: 838–849
- Hennig L., Poppe C., Sweere U., Martin A., Schäfer E. (2001) Negative interference of endogenous phytochrome B with phytochrome A function in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 125: 1036–1044
- Heyer A., Gatz C. (1992a) Isolation and characterization of a cDNA clone coding for potato type A phytochrome. *Plant Molecular Biology* 18: 535-543
- Heyer A., Gatz C. (1992b) Isolation and characterization of a cDNA clone coding for potato type B phytochrome. *Plant Molecular Biology* 20: 589-600
- Hirner A., Ladwig F., Stransky H., Okumoto S., Keinath M., Harms A., Frommer W.B., Koch W. (2006) *Arabidopsis* LHT1 is a high-affinity transporter for cellular amino acid uptake in both root epidermis and leaf mesophyll. *The Plant Cell* 18: 1931-1946
- Hisamatsu T., King R.W., Helliwell C.A., Koshioka M. (2005) The involvement of gibberellin 20-oxidase genes in phytochrome-regulated petiole elongation of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 138: 1106–1116

- Houssa P., Bernier G., Kinet J.M. (1991) Qualitative and quantitative analysis of carbohydrates in leaf exudates of the short-day plant, *Xanthium strumarium* L. during floral transition. *Journal of Plant Physiology* 138: 24-28
- Huq E., Tepperman J.M., Quail P.H. (2000) GIGANTEA is a nuclear protein involved in phytochrome signaling in *Arabidopsis*. *PNAS* 97: 9789–9794
- Imaizumi T., Schultz T.F., Harmon F.G., Ho L.A. Kay S.A. (2005) FKF1 F-box protein mediates cyclic degradation of a repressor of CONSTANS in *Arabidopsis*. *Science* 309: 293-297
- Imaizumi T., Tran H. G., Swartz T.E., Briggs W.R., Kay S.A. (2003) FKF1 is essential for photoperiodic-specific light signalling in *Arabidopsis*. *Nature* 426: 302–306
- Imlau A., Truernit E., Sauer N. (1999) Cell-to-cell and long-distance trafficking of the green fluorescent protein in the phloem and symplastic unloading of the protein into sink tissues. *The Plant Cell* 11: 309–322
- Iris V.F., Sussex I.M. (1990) Function of the *apetala-1* gene during *Arabidopsis* floral development. *The Plant Cell* 2: 741-753
- Ishikawa R., Tamaki S., Yokoi S., Inagaki N., Shinomura T., Takano M., Shimamoto K. (2005) Suppression of the floral activator Hd3a is the principal cause of the night break effect in rice. *The Plant Cell* 17: 3326–3336

- Ito S., Nakamichi N., Nakamura Y., Niwa Y., Kato T., Murakami M., Kita M., Mizoguchi T., Niinuma K., Yamashino T., Mizuno T. (2007) Genetic linkages between circadian clock-associated components and phytochrome-dependent red light signal transduction in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* 48: 971-983
- Izawa T., Oikawa T., Tokutomi S., Okuno K., Shimamoto K. (2000) Phytochrome confer the photoperiodic control of flowering in rice (a short-day plant). *The Plant Journal* 22: 391-399
- Jackson S. D. (1999) Multiple signaling pathways control tuber induction in potato. *Plant Physiology* 119: 1-8
- Jackson S., James P., Prat S., Thomas B. (1998) Phytochrome B affects the level of a graft-transmissible signal involved in tuberization. *Plant Physiology* 117: 29-32
- Jackson S., Thomas B. (1997) Photoreceptors and signals in the photoperiodic control of development. *Plant, Cell and Environment* 20: 790-795
- Jackson S.D., Heyer A., Dietze J., Prat S. (1996) Phytochrome B mediates the photoperiodic control of tuber formation in potato. *The Plant Journal* 9: 159-166
- Jackson S.D., James P.E., Carrera E., Prat S., Thomas B. (2000) Regulation of transcript levels of a potato gibberellin 20-oxidase gene by light and phytochrome B. *Plant Physiology* 124: 423-430

- Jackson S.D., Prat S. (1996) Control of tuberization in potato by gibberellins and phytochrome B. *Plant Physiology* 95: 407-412
- Jaeger K.E., Wigge P.A. (2007) FT protein acts as a long-range signal in Arabidopsis. *Current of Biology* 17: 1050–1054
- Jang S., Marchal V., Panigrahi K.C., Wenkel S., Soppe W., Deng X.W., Valverde F., Coupland G. (2008) Arabidopsis COP1 shapes the temporal pattern of CO accumulation conferring a photoperiodic flowering response. *EMBO Journal* 27: 1277-1288
- Jarillo J.A., Capel J., Tang R.H., Yang H.Q., Alonso J.M., Ecker J.R., Cashmore A.R. (2001) An Arabidopsis circadian clock component interacts with both CRY1 and phyB. *Nature* 410: 487-490
- Jiang C., Fu X. (2007) GA action: turning on de-DELTA repressing signalling. *Current Opinion in Plant Biology* 10: 461–465
- Jiao Y., Lau O.S., Deng X.W. (2007) Light-regulated transcriptional networks in higher plants. *Nature Reviews Genetics* 8: 217-230
- Johnson A.C., Strasser B., Cerdán P.D., Amasino R.M. (2008) Acceleration of flowering during shade-avoidance in Arabidopsis thaliana alters the balance between FLOWERING LOCUS C-mediated repression and photoperiodic induction of FLOWERING. *Plant Physiology Preview*  
<http://www.plantphysiol.org/cgi/content/abstract/pp.108.125468v1>

- Kamiya Y., García-Martínez J.L. (1999) Regulation of gibberellin biosynthesis by light. *Current Opinion in Plant Biology* 2: 398-403
- Kardailsky I., Shukla V.K., Hoon Ahn J., Dagenais N., Christensen S.K., Nguyen J.T., Chory J., Harrison M.J., Weigel D. (1999) Activation tagging of the floral inducer FT. *Science* 286: 1962-1965
- Kim S.J., Yu X., Michaels S.D. (2008) Regulation of CONSTANS and FLOWERING LOCUS T expression in response to changing light quality. *Plant Physiology* 148: 269-279
- King K.E., Moritz T., Harberd N.P. (2001a) Gibberellins are not required for normal stem growth in *Arabidopsis thaliana* in the absence of GAI and RGA. *Genetics* 159: 767–776
- King R.W., Evans L.T. (2003) Gibberellins and flowering of grasses and cereals: prizing open the lid of the florigen black box. *Annual Review of Plant Biology* 54: 307-328
- King R.W., Moritz T., Evans L.T., Martin J., Andersen C.H., Blundell C., Kardailsky I., Chandler P.M. (2006) Regulation of flowering in the long-day grass *Lolium temulentum* by gibberellins and the FLOWERING LOCUS T gene. *Plant Physiology* 141: 498-507
- Kloosterman B., Navarro C., Bijsterbosch G., Lange T., Prat S., Visser R.G.F. Bachem C.W.B. (2007) StGA2ox1 is induced prior to stolon swelling and controls GA levels during potato tuber development. *The Plant Journal* 52: 362–373

- Knop C., Voitsekhovskaja O., Lohaus G. (2001) Sucrose transporters in two members of the Scrophulariaceae with different types of transport sugar. *Planta* 213: 80-91
- Kobayashi Y., Kaya H., Goto K., Iwabuchi M., Araki T. (1999) A pair of related genes with antagonistic roles in mediating flowering signals. *Science* 286: 1960-1962
- Kobayashi Y., Weigel D. (2007) Move on up, it's time for change-mobile signals controlling photoperiod-dependent flowering. *Genes and Development* 21: 2371-2384
- Kojima S., Takahashi Y., Kobayashi Y., Monna L., Sasaki T. (2002) Hd3a, a rice ortholog of the Arabidopsis FT gene, promotes transition to flowering downstream of Hd1 under short-day conditions. *Plant Cell Physiology* 43:1096–1005
- Kolbe A., Tiessen A., Schluepmann H., Paul M., Ulrich S., Geigenberger P. (2005) Trehalose 6-phosphate regulates starch synthesis via posttranslational redox activation of ADP-glucose pyrophosphorylase. *PNAS* 102: 11118–11123
- Konstantinova T.N., Aksenova N.P., Golyanovskaya S.A., Sergeeva L.I. (1999) Photoperiodic control of tuber formation in Potato *Solanum tuberosum* ssp. *andigena* in vivo and in vitro. *Russian Journal of Plant Physiology* 46: 763-766
- Koornneef M., Alonso-Blanco C., Peeters A.J.M., Soppe W. (1998) Genetic control of flowering time in Arabidopsis. *Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology* 49: 345-370



- Koornneef M., Elgersma A., Hanhart C.J., Loenen-Martinet E.P., Rign L., Zeevaart J.A.D. (1985) A gibberellin insensitive mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum* 65: 33–39
- Kozuka T., Horiguchi G., Kim G.-T., Ohgishi M., Sakai T., Tsukaya H. (2005) The different growth responses of the *Arabidopsis thaliana* leaf blade and the petiole during shade avoidance are regulated by photoreceptors and sugar. *Plant Cell Physiology* 46: 213–223
- Krügel U., Veenhoff L.M., Langbei J., Wiederhold E., Liesche J., Friedrich T., Grimm B., Martinoia E., Poolman B., Kühn C. (2008) Transport and Sorting of the *Solanum tuberosum* sucrose transporter SUT1 is affected by posttranslational modification. *The Plant Cell* 20: 2497–2513
- Kühn C. (2003) A comparison of the sucrose transporter systems of different plant species. *Plant Biology* 5: 215-232
- Kühn C., Franceschi V.R., Schulz A., Lemoine R., Frommer W.B. (1997) Macromolecular trafficking indicated by localization and turnover of sucrose transporters in enucleate sieve elements. *Science* 275: 1298-1300
- Kühn C., Hajirezaei M.-R., Fernie A.R., Roessner-Tunali U., Czechowski T., Hirnar B., Frommer W.B. (2003) The sucrose transporter StSUT1 localizes to sieve elements in potato tuber phloem and influences tuber physiology and development. *Plant Physiology* 131: 102-113

- Kühn C., 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 and Environment* 19: 1115-1123
- Kuiper D. (1993) Sink strength: Established and regulated by plant growth regulators. *Plant, Cell and Environment* 16: 1025-1026
- Lalonde S., Weise A., Walsh R.P., Ward J.M., Frommer W.B. (2003) Fusion to GFP blocks intercellular trafficking of the sucrose transporter SUT1 leading to accumulation in companion cells. *BMC Plant Biology* 3: 8-18
- Laubinger S., Fittinghoff K., Hoecker U. (2004) The SPA quartet: A family of WD-repeat proteins with a central role in suppression of photomorphogenesis in Arabidopsis. *The Plant Cell* 16: 2293–2306
- Laubinger S., Marchal V., Le Gourrierec J., Wenkel S., Adrian J., Jang S., Kulajta C., Braun H., Coupland G., Hoecker U. (2006) Arabidopsis SPA proteins regulate photoperiodic flowering and interact with the floral inducer CONSTANS to regulate its stability. *Development* 133: 3213–3222
- Lee H., Suh S.-S., Park E., Cho E., Ahn J.H., Kim S.-G., Lee J.S., Kwon Y.M., Lee I. (2000) The AGAMOUS-LIKE 20 MADS domain protein integrates floral inductive pathways in Arabidopsis. *Genes and Development* 14: 2366-2376
- Leggewie G. (1996) Transportvorgänge in höheren Pflanzen am Beispiel des Phosphat- und Saccharosetransporters in *Solanum tuberosum* L. Dissertation Mathematisch-

Naturwissenschaftlichen Fakultät I Institut für Biologie, Humboldt-Universität, Berlin,  
Germany

Leggewie G., Kolbe A., Lemoine R., Roessner U., Lytovchenko A., Zuther E., Kehr J.,  
Frommer W.B., Riesmeier J.W., Willmitzer L., Fernie A.R. (2003) Overexpression of  
the sucrose transporter SoSUT1 in potato results in alterations in leaf carbon partitioning  
and in tuber metabolism but has little impact on tuber morphology. *Planta* 217:  
158-167

Lemoine R., Bürkle L., Barker L., Sarkr S., Kühn C., Regnacq M., Gaillard C., Delrot S.,  
Frommer W.B. (1999) Identification of a pollen-specific sucrose transporter-like protein  
NtSUT3 from tobacco. *FEBS Letters* 454: 325-330

Liesche J., Schulz A., Krügel U., Grimm B., Kühn C. (2008) Dimerization and endocytosis of  
the sucrose transporter StSUT1 in mature sieve elements. *Plant Signaling and Behavior* 3: 1-2

Lifschitz E., Eviatar T., Rozman A., Shalit A., Goldshmidt A. (2006) The tomato FT ortholog  
triggers systemic signals that regulate growth and flowering and substitute for diverse  
environmental stimuli. *PNAS* 103: 6398–6403

Lin C., Yang H., Guo H., Mockler T., Chen J., Cashmore A.R. (1998) Enhancement of blue-  
light sensitivity of Arabidopsis seedlings by a blue light receptor cryptochrome 2.  
*PNAS* 95: 2686–2690

- Liu L.J., Zhang Y.C., Li Q.H., Sang Y., Mao J., Lian H.L., Wang L., Yang H.Q. (2008) COP1-mediated ubiquitination of CONSTANS is implicated in cryptochrome regulation of flowering in Arabidopsis. *The Plant Cell* 20: 292-306
- López-Juez E., Kobayashi M., Sakurai A., Kamiya Y., Kendrick R.E. (1995) Phytochrome, gibberellins, and hypocotyl growth. A study using the cucumber (*Cucumis sativus*) long hypocotyl mutant. *Plant Physiology* 107: 131-140
- Loreti E., Povero G., Novi G., Solfanelli C., Alpi A., Perata P. (2008) Gibberellins, jasmonate and abscisic acid modulate the sucrose-induced expression of anthocyanin biosynthetic genes in Arabidopsis. *New Phytologist* 179: 1004–1016
- Lough T.J., Lucas W.J. (2006) Integrative plant biology: Role of phloem long-distance macromolecular trafficking. *Annual Review of Plant Biology* 57: 203-232
- Lu C., Tej S.S., Luo S., Haudenschild C.D., Meyers B.C., Green P.J. (2005) Elucidation of the small RNA component of the transcriptome. *Science* 309: 1567-1569
- Lucas M. de, Davière J.-M., Rodriguez-Falcón M., Pontin M., Iglesias-Pedraz J.M., Lorrain S., Fankhauser C., Blázquez M.A., Titarenko E., Prat S. (2008) A molecular framework for light and gibberellin control of cell elongation. *Nature* 451: 480-486
- Macháčkowá I., Konstantinova T.N., Sergeeva L.K., Lozhnikova V.N., Golyanovskaya S.A., Dudko N.D., Eder J., Aksenova N.P. (1998) Photoperiodic control of growth, development and phytohormone balance in *Solanum tuberosum*. *Physiologia Plantarum* 102: 272-278

- Macknight R., Bancroft I., Page T., Lister C., Schmidt R., Love K., Westphal L., Murphy G., Sherson S., Cobbett C. (1997) FCA, a gene controlling flowering time in Arabidopsis, encodes a protein containing RNA-binding domains. *Cell* 89: 737–745
- Mares D.J., Marschner H., Krauss A. (1981) Effect of gibberellic acid on growth and carbohydrate metabolism of developing tubers of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Plant Physiology* 52: 267-274
- Martínez-García J.F., Martínez-García J.L., Bou J., Prat S. (2002a) The interaction of gibberellins and photoperiod in the control of potato tuberization. *Journal of Plant Growth Regulation* 20: 377-386
- Martínez-García J.F., Virgós-Soler A., Prat S. (2002b) Control of photoperiod-regulated tuberization in potato by the Arabidopsis flowering-time gene *CONSTANS*. *PNAS* 99: 15211–15216
- Más P., Kim W.-Y., Somers D.E., Kay S.A. (2003) Targeted degradation of TOC1 by ZTL modulates circadian function in Arabidopsis thaliana. *Nature* 426: 567-570
- Mathieu J., Warthmann N., Küttner F., Schmid M. (2007) Export of FT protein from phloem companion cells is sufficient for floral induction in Arabidopsis. *Current Biology* 17: 1055–1060
- McGinnis K.M., Thomas S.G., Soule J.D., Strader L.C., Zale J.M., Sun T.P., Steber C.M. (2003) The Arabidopsis *SLEEPY1* gene encodes a putative F-box subunit of an SCF E3 ubiquitin ligase. *The Plant Cell* 15: 1120-1130

- Meyer S., Lauterbach C., Niedermeier M., Barth I., Sjolund R.D., Sauer N. (2004) Wounding enhances expression of AtSUC3, a sucrose transporter from Arabidopsis sieve elements and sink tissues. *Plant Physiology* 134: 684–693
- Mizoguchi T., Wright L., Fujiwara S., Cremer F., Lee K., Onouchi H., Mouradov A., Fowler S., Kamada H., Putterill J., Coupland G. (2005) Distinct roles of GIGANTEA in promoting flowering and regulating circadian rhythms in Arabidopsis. *The Plant Cell* 17: 2255–2270
- Mockler T., Yang H., Yu X.H., Parikh D., Cheng Y., Dolan S., Lin C. (2003) Regulation of photoperiodic flowering by Arabidopsis photoreceptors. *PNAS* 100: 2140-2145
- Molinero-Rosales N., Latorre A., Jamilena M., Lozano R. (2004) SINGLE FLOWER TRUSS regulates the transition and maintenance of flowering in tomato. *Planta* 218: 427-434
- Moon J., Lee H., Kim M., Lee I. (2005) Analysis of flowering pathway integrators in Arabidopsis. *Plant and Cell Physiology* 46: 292-299
- Moon J., Suh S.-S., Lee H., Choi K.-R., Hong C.B., Paek N.-C., Kim S.-G., Lee I. (2003) The SOC1 MADS-box gene integrates vernalization and gibberellin signals for flowering in Arabidopsis. *The Plant Journal* 35: 613–623
- Mouradov A., Cremer F., Coupland G. (2002) Control of flowering time: interacting pathways as a basis for diversity. *The Plant Cell* 14: 111-130

Müller-Röber B., Sonnewald U., Willmitzer L. (1992) Inhibition of the ADP-glucose pyrophosphorylase in transgenic potatoes leads to sugar-storing tubers and influences tuber formation and expression of tuber storage protein genes. *EMBO Journal* 11: 1229-1238

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

Mustroph A. (2006) Bedeutung von Fermentation, Photosynthese und Pyrophosphat für das Überleben von Pflanzen unter Sauerstoffmangel. Dissertation Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I Institut für Biologie, Humboldt-Universität, Berlin, Germany

Nagatani A. (2004) Light-regulated nuclear localization of phytochromes. *Current Opinion in Plant Biology* 7: 708–711

Nakajima M., Shimada A., Takashi Y., Kim Y.-C., Park S.-H., Ueguchi-Tanaka M., Suzuki H., Katoh E., Iuchi S., Kobayashi M., Maeda T., Matsuoka M., Yamaguchi I. (2006) Identification and characterization of Arabidopsis gibberellin receptors. *The Plant Journal* 46: 880–889

Nicot N., Hausman J.-F., Hoffmann L., Evers D. (2005) Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. *Journal of Experimental Botany* 56: 2907-2914

Offler C.E., McCurdy D.W., Patrick J.W., Talbot M.J. (2003) Transfer cells: cells specialized for a special purpose. *Annual Review of Plant Biology* 54: 431-454

- Ohto M., Onai K., Furukawa Y., Aoki E., Araki T., Nakamura K. (2001) Effects of sugar on vegetative development and flora transition in Arabidopsis. *Plant Physiology* 127: 252-261
- Olszewski N., Sun T.-p., Gubler F. (2002) Gibberellin signaling: biosynthesis, catabolism, and response pathways. *The Plant Cell* 14: 61–80
- Onouchi H., Igeño M.I., Périlleux C., Graves K., Coupland G. (2000) Mutagenesis of plants overexpressing CONSTANS demonstrates novel interactions among Arabidopsis flowering-time genes. *The Plant Cell* 12: 885-900
- Oparka K.J., Roberts A.G., Boevink P., Santa Cruz S., Roberts I., Pradel K.S., Imlau A., Kottlitzky G., Sauer N., Epel B. (1999) Simple, but not branched, plasmodesmata allow the nonspecific trafficking of proteins in developing tobacco leaves. *Cell* 97: 743-754
- Ormenese S., Havelange A., Deltour R., Bernier G. (2000) The frequency of plasmodesmata increases early in the whole shoot apical meristem of *Sinapis alba* L. during floral transition. *Planta* 211: 370-375
- Ormenese S., Bernier G., Périlleux C. (2006) Cytokinin application to the shoot apical meristem of *Sinapis alba* enhances secondary plasmodesmata formation. *Planta* 224: 1432-2048
- Palauqui J.-C., Elmayan T., Pollien J.-M., Vaucheret H. (1997) Systemic acquired silencing: transgene-specific post-transcriptional silencing is transmitted by grafting from silenced stocks to non-silenced scions. *The EMBO Journal* 16: 4738–4745



Parcy F. (2005) Flowering: a time for integration. *The International Journal of Developmental Biology* 49: 585-593

Park D.H., Somers D.E., Suk Kim Y., Hi Choy Y., Kyun Lim H., Soo Soh M., Jung Kim H., Kay S.A., Gil Nam H. (1999) Control of circadian rhythms and photoperiodic flowering by the *Arabidopsis* GIGANTEA gene. *Science* 285: 1579-1582

Patrick J., Offler C. (1996) Post-sieve element transport of photoassimilates in sink regions. *Journal of Experimental Botany* 47: 1165-1177

Peirson S.N., Butler J.N., Foster R.G. (2003) Experimental validation of novel and conventional approach to quantitative real-time PCR data analysis. *Nucleic Acid Research* 31: 1-7

Peng J., Harberd N.P. (1997) Gibberellin deficiency and response mutations suppress the stem elongation phenotype of phytochrome-deficient mutants of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 113: 1051-1058

Perata P., Matsukura C., Vernieri P., Yamaguchi J. (1997) Sugar repression of a gibberellin-dependent signaling pathway in barley embryos. *The Plant Cell* 9: 2197-2208

Pierik R., Cuppens M.L., Voeselek L.A., Visser E.J. (2004a) Interactions between ethylene and gibberellins in phytochrome-mediated shade avoidance responses in tobacco. *Plant Physiology* 136: 2928-2936

- Pierik R., Whitelam G.C., Voeselek L.A.C.J., de Kroon H. Visser E.J.W. (2004b) Canopy studies on ethylene-insensitive tobacco identify ethylene as a novel element in blue light and plant-plant signalling. *The Plant Journal* 38: 310-319
- Putterill J., Robson F., Lee K., Simon R., Coupland G. (1995) The CONSTANS gene of Arabidopsis promotes flowering and encodes a protein showing similarities to zinc finger transcription factors. *Cell* 80: 847-857
- Quail P.H. (2002) Photosensory perception and signalling in plant cells: new paradigms? *Current Opinion in Cell Biology* 14: 180–188
- Ramakers C., Ruijter J.M., Lekanke Deprez R.H., Moorman A.F.M. (2003) Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neuroscience Letters* 339: 62-66
- Ransom-Hodgkins W., Vaughn M., Bush D. (2003) Protein phosphorylation plays a key role in sucrose-mediated transcriptional regulation of a phloem-specific proton–sucrose symporter. *Planta* 217: 483-489
- Reed J.W., Foster K.R., Morgan P.W., Chory J. (1996) Phytochrome B affects responsiveness to gibberellins in Arabidopsis. *Plant Physiology* 112: 337-342
- Reed J.W., Nagatani A., Elich T.D., Fagan M., Chory J. (1994) Phytochrome A and phytochrome B have overlapping but distinct functions in Arabidopsis development. *Plant Physiology* 104: 1139-1149

- Reeves P.H., Coupland G. (2001) Analysis of flowering time control in Arabidopsis by comparison of double and triple mutants. *Plant Physiology* 126: 1085-1091
- Reinders A., Schulze W., Kühn C., Barker L., Schulz A., Ward J.M., Frommer W.B. (2002) Protein-protein interactions between sucrose transporters of different affinities colocalized in the same enucleate sieve element. *The Plant Cell* 14: 1567-1577
- Reinders A., Schulze W., Thamiy S., Stagljar I., Frommer W.B., Ward J.M. (2002) Intra- and intermolecular interactions in sucrose transporters at the plasma membrane detected by the split-ubiquitin system and functional assays. *Structure* 10: 763-772
- Reinders A., Sivitz A.B., Starker C.G., Gantt J.S., Ward J.M. (2008) Functional analysis of LjSUT4, a vacuolar sucrose transporter from *Lotus japonicus*. *Plant molecular biology* 68: 289-299
- Reins J. (2006) Suche nach Protein-Interaktionen der Saccharosetransporter StSUT1 und StSUT4 aus *Solanum tuberosum* L. mit dem Split-Ubiquitin-System. Diplomarbeit. Humboldt Universität, Berlin, Germany
- Richards D.E., King K.E., Ait-ali T., Harberd N.P. (2001) How gibberellin regulates plant growth and development. A molecular genetic analysis of gibberellin signaling. *Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology* 52: 67-88
- Rideout J.W., Raper C.D.J., Miner G.S. (1992) Changes in ratio of soluble sugars and free amino nitrogen in the apical meristem during floral transition of tobacco. *International Journal of Plant Science* 153: 78-88

- Riesmeier J.W., Frommer W.B. (1994) Einfluß der Überexpression von Saccharosetransportern auf das Blühverhalten von Pflanzen. German Patent, P 44 39 748.8
- Riesmeier J.W., Willmitzer L., Frommer W.B. (1994) Evidence for an essential role of the sucrose transporter in phloem loading and assimilate partitioning. *The EMBO Journal* 13: 1-7
- Riesmeier J.W., Willmitzer L., Frommer W.B. (1992) Isolation and characterization of a sucrose carrier cDNA from spinach by functional expression in yeast. *The EMBO Journal* 11: 4705-4713
- Roberts A.G., Santa Cruz S., Roberts I.M., Prior D.A.M., Turgeon R., Oparka K.J. (1997) Phloem unloading in sink leaves of *Nicotiana benthamiana*: comparison of the fluorescent solute with a fluorescent virus. *The Plant Cell* 9: 1381-1396
- Rocha-Sosa M., Sonnewald U., Frommer U., Stratmann M., Schell J., Willmitzer, L. (1989) Both developmental and metabolic signals activate the promoter of a class I patatin gene. *The EMBO Journal* 8: 23-29
- Rodríguez-Falcón M., Bou J., Prat S. (2006) Seasonal control of tuberization in potato: conserved elements with the flowering response. *Annual Review of Plant Biology* 57: 151-180
- Roldán M., Gómez-Mena C., Ruiz-García L., Salinas J., Martínez-Zapater J.M. (1999) Sucrose availability on the aerial part of the plant promotes morphogenesis and flowering of *Arabidopsis* in the dark. *The Plant Journal* 20: 581-590

- Rolland F., Baena-Gonzales E., Sheen J. (2006) Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annual Review of Plant Biology* 57: 675-709
- Rolland F., Moore B., Sheen J. (2002) Sugar sensing and signaling in plants. *The Plant Cell* 14: 185-205
- Rolland N., Ferro M., Seigneurin-Berny D., Garin J., Douce R., Joyard J. (2003) Proteomics of chloroplast envelope membranes. *Photosynthese Research* 78: 205–230
- Rosin F.M., Hart J.K., Horner H.T., Davies P.J., Hannapel D.J. (2003) Overexpression of a knotted-like homeobox gene of potato alters vegetative development by decreasing gibberellin accumulation. *Plant Physiology* 132: 106-117
- Rousseaux M.C., Ballaré C.L., Jordan E.T., Vierstra R.D. (1997) Directed overexpression of PHYA locally suppresses stem elongation and leaf senescence responses to far-red radiation. *Plant, Cell and Environment* 20: 1551-1558
- Ruiz-Medrano R., Xoconostle-Cázares B., Lucas W.J. (1999) Phloem long-distance transport of CmNACPmRNA: implications for supracellular regulation in plants. *Development* 126: 4405-4419
- Ryu J.S., Kim J.-I., Kunkel T., Kim B.C., Cho D.S., Hong S.H., Kim S.-H., Piñas Fernández A., Kim Y., Alonso J.M., Ecker J.R., Nagy F., Ok Lim P., Song P.-S., Schäfer E., Gil Nam H. (2005) Phytochrome-specific type 5 phosphatase controls light signal flux by enhancing phytochrome stability and affinity for a signal transducer. *Cell* 120: 395–406

- Salter M.G., Franklin K.A., Whitelam G.C. (2003) Gating of the rapid shade-avoidance response by the circadian clock in plants. *Nature* 426: 680-683
- Samach A., Onouchi H., Gold S.E., Ditta G.S., Schwarz-Sommer Z., Yanofsky M.F., Co-  
upland G. (2000) Distinct roles of CONSTANS target genes in reproductive development of *Arabidopsis*. *Science* 288: 1613-1616
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*, Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, USA
- Sarkar D. (2008) The signal transduction pathways controlling in planta tuberization in potato: an emerging synthesis. *Plant Cell Reports* 27: 1-8
- Sasaki A., Itoh H., Gomi K., Ueguchi-Tanaka M., Ishiyama K., Kobayashi M., Jeong D. H., An G., Kitano H., Ashikari M., Matsuoka M. (2003) Accumulation of phosphorylated repressor for gibberellin signaling in an F-box mutant. *Science* 299: 1896-1898
- Sauer N., Stolz J. (1994) SUC1 and SUC2: two sucrose transporters from *Arabidopsis thaliana*; expression and characterization in baker's yeast and identification of the histidine-tagged protein *Plant Journal* 6: 67-77
- Sawa M., Nusinow D.A., Kay S.A., Imaizumi T. (2007) FKF1 and GIGANTEA complex formation is required for day-length measurement in *Arabidopsis*. *Science* 318: 261-265

- Schaffer R., Ramsay N., Samach A., Corden S., Putterill J., Carré I.A., Coupland G. (1998) The late elongated hypocotyl mutation of *Arabidopsis* disrupts circadian rhythms and the photoperiodic control of flowering. *Cell* 93: 1219-1229
- Schittenhelm S., Menge-Hartmann U., Oldenburg E. (2004) Photosynthesis, carbohydrate metabolism, and yield of phytochrome-B-overexpressing potatoes under different light regimes. *Crop Science* 44: 131–143
- Schmidt R., Mohr H. (1981) Time-dependent changes in the responsiveness to light of phytochrome-mediated anthocyanin synthesis. *Plant Cell and Environment* 4: 443-437
- Schopfer P., Brennicke A. (1999) *Pflanzenphysiologie*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany ISBN 3-540-64231-5
- Schulze W., Reinders A., Ward J., Lalonde S., Frommer W.B. (2003) Interactions between co-expressed *Arabidopsis* sucrose transporters in the split-ubiquitin system. *BMC Biochemistry* 4: 3-12
- Schulze W., Weise A., Frommer W.B., Ward J.M. (2000) Function of the cytosolic N-terminus of sucrose transporter AtSUT2 in substrate affinity. *FEBS Letters* 485: 189-194
- Searle I., Coupland G. (2004) Induction of flowering by seasonal changes in photoperiod. *The EMBO Journal* 23: 1217–1222

- Searle I., He Y., Turck F., Vincent C., Fornara F., Kröber S., Amasino R.A., Coupland G. (2006) The transcription factor FLC confers a flowering response to vernalization by repressing meristem competence and systemic signaling in Arabidopsis. *Genes and Development* 20: 898-912
- Shen W.J., Forde B.G. (1989) Efficient transformation of *Agrobacterium* spp. by high voltage electroporation. *Nucleic Acid Research* 17: 8385
- Sieburth L.E., Deyholos M.K. (2006) Vascular development: the long and winding road. *Current Opinion in Plant Biology* 9: 48–54
- Silverstone A.L., Jung H.-S., Dill A., Kawaide H., Kamiya Y., Sun T.-p. (2001) Repressing a repressor: gibberellin-induced rapid reduction of the RGA protein in Arabidopsis. *The Plant Cell* 13: 1555–1565
- Sivitz A.B., Reinders A., Ward J.M. (2008) Arabidopsis sucrose transporter AtSUC1 function. Arabidopsis sucrose transporter AtSUC1 is important for pollen germination and sucrose-induced anthocyanin accumulation. *Plant Physiology* 147: 92-100
- Sjölund R.D. (1997) The phloem sieve element: A river runs through it. *The Plant Cell* 9: 1137-1146
- Solfanelli C., Poggi A., Loreti E., Alpi A., Perata P. (2006) Sucrose-specific induction of the anthocyanin biosynthetic pathway in Arabidopsis. *Plant Physiology* 140: 637–646



- Somers D.E., Webb A.A., Pearson M., Kay S.A. (1998) The short-period mutant, *toc1-1*, alters circadian clock regulation of multiple outputs throughout development in *Arabidopsis thaliana*. *Development* *125*: 485-494
- Soppe W.J.J., Bentsink L., Koornneef M. (1999) The early-flowering mutant *efs* is involved in the autonomous promotion pathway of *Arabidopsis thaliana*. *Development* *126*: 4763-4770
- Stadler R., Brandner J., Schulz A., Gahrz M., Sauer N. (1995) Phloem loading by the Pm-SUC2 sucrose carrier from *Plantago major* occurs into companion cells. *The Plant Cell* *7*: 1545-1554
- Stadler R., Sauer N. (1996) The *Arabidopsis thaliana* AtSUC2 gene is specifically expressed in companion cells. *Botanica Acta* *109*: 299-306
- Stadler R., Truernit E., Gahrz M., Sauer N. (1999) The AtSUC1 sucrose carrier may represent the osmotic driving force for anther dehiscence and pollen tube growth in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* *19*: 269-278
- Stitt M., Bulpin P.V., Rees T. (1978) Pathway of starch breakdown in photosynthetic tissues of *Pisum sativum*. *Biochimica et Biophysica Acta* *544*: 200-214
- Stitt M., Lilley R.M.C., Gerhard R., Heldt H.W. (1989) Metabolite levels in specific cells and subcellular compartments of plant leaves. *Methods Enzymology* *174*: 518-552

- Suarez-Lopez P., Wheatley K., Robson F., Onouchi H., Valverde F., Coupland G. (2001) CONSTANS mediates between the circadian clock and the control of flowering in Arabidopsis. *Nature* 410: 1116-1120
- Tadege M., Sheldon C.C., Helliwell C.A., Upadhyaya N.M., Dennis E.S., Peacock W.J. (2003) Reciprocal control of flowering time by OsSOC1 in transgenic Arabidopsis and by FLC in transgenic rice. *Plant Biotechnology Journal* 1: 361–369
- Taiz L., Zeiger E. (2006) *Plant Physiology*, Sinauer Associates, Sunderland, USA ISBN 0-87893-856-7
- Takada S., Goto K. (2003) TERMINAL FLOWER2, an Arabidopsis homolog of HETEROCHROMATIN PROTEIN1, counteracts the activation of FLOWERING LOCUS T by CONSTANS in the vascular tissues of leaves to regulate flowering time. *The Plant Cell* 15: 2856-2865
- Thayer S.S., Björkman O. (1990) Leaf xanthophyll content and composition in sun and shade determined by HPLC. *Photosynthesis Research* 23: 331-343
- Thomas B. (2006) Light signals and flowering. *Journal of Experimental Botany* 15: 1-7
- Tiessen A., Hendriks J.H.M., Stitt M., Branscheid A., Gibon Y., Farré E.M. Geigenberger P. (2002) Starch synthesis in potato tubers is regulated by post-translational redox-modification of ADP-glucose pyrophosphorylase: a novel regulatory mechanism linking starch synthesis to the sucrose supply. *The Plant Cell* 14: 2191-2213

- Tiessen A., Prescha K., Branscheid A., Palacios N., McKibbin R., Halford N.G., Geigenberger P. (2003) Evidence that SNF1-related kinase and hexokinase are involved in separate sugar-signalling pathways modulating post-translational redox activation of ADP-glucose pyrophosphorylase in potato tubers. *The Plant Journal* 35: 490-500
- Tooke F., Battey N.H. (2000) A leaf-derived signal is a quantitative determinant of floral form in *Impatiens*. *The Plant Cell* 12: 1837-1848
- Töpfer R., Matzeit V., Gronenborn B., Schell J., Steinbiss H.H. (1987) A set of plant expression vectors for transcriptional and translational fusions. *Nucleic Acids Research* 15: 5890-5891
- Truernit E., Sauer N. (1995) The promoter of the *Arabidopsis thaliana* SUC2 sucrose-H<sup>+</sup> symporter gene directs expression of beta-glucuronidase to the phloem: evidence for phloem loading and unloading by SUC2. *Planta* 196: 564-570
- Tseng T.S., Salome P.A., McClung C.R., Olszewski N.E. (2004) SPINDLY and GIGANTEA interact and act in *Arabidopsis thaliana* pathways involved in light responses, flowering, and rhythms in cotyledon movements. *The Plant Cell* 16: 1550-1563
- Turck F., Fornara F., Coupland G. (2008) Regulation and identity of florigen: FLOWERING LOCUS T moves center stage. *Annual Review of Plant Biology* 59: 573-594
- Turgeon R. (1996) Phloem loading and plasmodesmata. *Trends in Plant Science* 1: 418-423

- Turgeon R., Beebe D.U., Gowan E. (1993) The intermediary cell: minor-vein anatomy and raffinose oligosaccharide synthesis in the Scrophulariaceae. *Planta* 191: 446–456
- Ueguchi-Tanaka M., Ashikari M., Nakajima M., Itoh H., Katoh E., Kobayashi M., Chow T., Hsing Y.C., Kitano H., Yamaguchi I., Matsuoka M. (2005) GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1 encodes a soluble receptor for gibberellin. *Nature* 437: 693-698
- Urbańczyk-Wochniak E., Baxter C., Kolbe A., Kopka J., Sweetlove L.J., Fernie A.R. (2005) Profiling of diurnal patterns of metabolite and transcript abundance in potato (*Solanum tuberosum*) leaves. *Planta* 221: 891-903
- Valverde F., Mouradov A., Soppe W., Ravenscroft D., Samach A., Coupland G. (2004) Photoreceptor regulation of CONSTANS protein in photoperiodic flowering. *Science* 303: 1003-1006
- Van Bel A.J.E. (1993) Strategies of phloem loading. *Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 44: 253-281
- Van Bel A.J.E. (2003) The phloem, a miracle of ingenuity. *Plant, Cell and Environment* 26: 125–149
- Van Bel A.J.E. (2003) Transport phloem: Low profile, high impact. *Plant Physiology* 131: 1509-1510

- Van Bel A.J.E., Gamalei Y.V., Ammerlaan A., Bik L.P.M. (1992) Dissimilar phloem loading in leaves with symplasmic or apoplasmic minor-vein configurations. *Planta* 186: 518–525
- Van den Berg J.H., Simko I., Davies P.J., Ewing E.E., Halinska A. (1995) Morphology and gibberellin A12 metabolism in wild-type and dwarf *Solanum tuberosum* spp. *Andigena* grown under long and short photoperiods. *Journal of Plant Physiology* 146: 467-473
- Vandenbussche F., Fierro A.C., Wiedemann G., Reski R., Der Van Straeten D. (2007) Evolutionary conservation of plant gibberellin signalling pathway components. *BMC Plant Biology* 7: 65-82
- Vandenbussche F., Pierik R., Millenaar F.F., Voeseek L.A.C.J., Van Der Straeten D. (2005) Reaching out of the shade. *Current Opinion in Plant Biology* 8: 462–468
- Vandesompele J., De Preter K., Pattyn F., Poppe B., Van Roy N., De Paepe A., Speleman F. (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology* 3: 4-12
- Vaughn M.W., Harrington G.N., Bush D.R. (2002) Sucrose-mediated transcriptional regulation of sucrose symporter activity in the phloem. *PNAS* 99: 10876–10880
- Veley K.M., Michaels S.D. (2008) Functional redundancy and new roles for genes of the autonomous floral-promotion pathway. *Plant Physiology* 147: 682-695

- Vervliet G., Holsters M., Teuchy H., Van Montagu M., Schell J. (1975) Characterization of different plaque-forming and defective temperate phages in *Agrobacterium*. *Journal of General Virology* 26: 33-48
- Viola R., Pelloux J., Van Der Ploeg A., Gillespie T., Marquis N., Roberts A.G., Hancock R.D. (2007) Symplastic connection is required for bud outgrowth following dormancy in potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers. *Plant, Cell and Environment* 30: 973–983
- Voitsekhovskaja O.V., Koroleva O.A., Batashev D.R., Knop C., Tomos A.D., Gamalei Y.V., Heldt H.-W., Lohaus G. (2006) Phloem loading in two scrophulariaceae species. What can drive symplastic flow via plasmodesmata? *Plant Physiology* 140: 383–395
- Von Lintig J., Welsch R., Bonk M., Giuliano G., Batschauer A., Kleinig H. (1997) Light-dependent regulation of carotenoid biosynthesis occurs at the level of phytoene synthase expression and is mediated by phytochrome in *Sinapis alba* and *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant Journal* 12: 625-34
- Von Schaewen A., Stitt M., Schmidt R., Sonnewald U., Willmitzer L. (1990) Expression of a yeast-derived invertase in the cell wall of tobacco and *Arabidopsis* plants leads to accumulation of carbohydrate and inhibition of photosynthesis and strongly influences growth and phenotype of transgenic tobacco plants. *The EMBO Journal* 9: 3033–3044
- Wang Z.Y., Tobin E.M. (1998) Constitutive expression of the CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1) gene disrupts circadian rhythms and suppresses its own expression. *Cell* 93: 1207-1217

- Weber A.P.M., Fischer K. (2007) Making the connections – The crucial role of metabolite transporters at the interface between chloroplast and cytosol. *FEBS Letters* 581: 2215–2222
- Weigel D., Alvarez J., Smyth D.R., Yanofsky M.F., Meyerowitz E.M. (1992) LEAFY controls floral meristem identity in Arabidopsis. *Cell* 69: 843-859
- 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: 1345–1355
- Welsch R., Beyer P., Hugueney P., Kleinig H., Von Lintig J. (2000) Regulation and activation of phytoene synthase, a key enzyme in carotenoid biosynthesis, during photomorphogenesis. *Planta* 211: 846-54
- Wen C.-K., Chang C. (2002) Arabidopsis RGL1 encodes a negative regulator of gibberellin responses. *The Plant Cell* 14: 87–100
- Wenkel S., Turck F., Singer K., Gissot L., Le Gourrierc J., Samach A., Coupland G. (2006) CONSTANS and the CCAAT box binding complex share a functionally important domain and interact to regulate flowering of Arabidopsis. *The Plant Cell* 18: 2971-2984
- Weschke W., Panitz R., Sauer N., Wang Q., Neubohn B., Weber H., Wobus U. (2000) Sucrose transport into barley seeds: molecular characterization of two transporters and implications for seed development and starch accumulation. *Plant Journal* 21: 455-467

- Wigge P.A., Chul Kim M., Jaeger K.E., Busch W., Schmid M., Lohmann J.U., Weigel D. (2005) Integration of spatial and temporal information during floral induction in *Arabidopsis*. *Science* 309: 1056-1059
- Williams L.E., Lemoine R., Sauer N. (2000) Sugar transporters in higher plants-a diversity of roles and complex regulation. *Trends in Plant Science* 5: 283-290
- Willige B.C., Ghosh S., Nill C., Zourelidou M., Dohmann E.M., Maier A., Schwechheimer C. (2007) The DELLA domain of GA INSENSITIVE mediates the interaction with the GA INSENSITIVE DWARF1A gibberellin receptor of *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 19: 1209-1220
- Wilson R.N., Heckman J.W., Somerville C.R. (1992) Gibberellin is required for flowering in *Arabidopsis thaliana* under short days. *Plant Physiology* 100: 403-408
- Wingler A., Fritzius T., Wiemken A., Boller T., Aeschbacher R.A. (2000) Trehalose induces the ADP-glucose pyrophosphorylase gene, *ApL3*, and starch synthesis in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 124: 105-114
- Woitke P., Martin C.-D., Nicklisch S., Kohl J.-G. (1994) HPLC determination of lipophilic photosynthetic pigments in algal cultures and lake water samples using a non-encapped C18-RP-column. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 348: 762-768
- Wong M.L., Medrano J.F. (2005) Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques* 39: 1-11



- Xoconostle-Cázares B., Xiang Y., Ruiz-Medrano R., Wang H.-L., Monzer J., Yoo B.-C., McFarland K.C., Franceschi V.R., Lucas W.J. (1999) Plant paralog to viral movement protein that potentiates transport of mRNA into the phloem. *Science* 283: 94-98
- Xu X., Van Lammeren M., Vermeer E., Vreugdenhil D. (1998) The role of gibberellin, abscisic acid, and sucrose in the regulation of potato tuber formation in vitro. *Plant Physiology* 117: 575–584
- Xu Y.-L., Gage D.A., Zeevaart J.A.D. (1997) Gibberellins and stem growth in *Arabidopsis thaliana* – effects of photoperiod on expression of the GA4 and GA5 loci. *Plant Physiology* 114: 1471-1476
- Yamaguchi A., Kobayashi Y., Goto K., Abe M., Araki T. (2005) TWIN SISTER OF FT (TSF) acts as a floral pathway integrator redundantly with FT. *Plant and Cell Physiology* 46: 1175-1189
- Yano M., Katayose Y., Ashikari M., Yamanouchi U., Monna L., Fuse T., Baba T., Yamamoto K., Umehara Y., Nagamura Y., Sasaki T. (2000) Hd1, a major photoperiod sensitivity quantitative trait locus in rice, is closely related to the *Arabidopsis* flowering time gene *CONSTANS*. *The Plant Cell* 12: 2473-2483
- Yanovsky M.J., Alconada-Magliano T.M., Wagmaister J.A., Gatz C., Jackson S.D., Thomas B., Casal J.J. (1998) Phytochrome A resets the circadian clock and delays tuber formation under long days in potato. *The Plant Journal* 23: 223-232

- Yanovsky M.J., Izaguirre M., Alconada-Magliano T.M., Mazzella M.A., Gatz C., Thomas B., Casal J.J. (1998) Phytochrome A affects stem growth, anthocyanin synthesis, sucrose-phosphate-synthase activity and neighbour detection in sunlight-grown potato. *Planta* 205: 235-241
- Yanovsky M.J., Kay S.A. (2002) Molecular basis of seasonal time measurement in *Arabidopsis*. *Nature* 419: 308-312
- Yoo B.-C., Kragler F., Varkonyi-Gasic E., Haywood V., Archer-Evans S., Moo Lee Y., Lough T.J., Lucas W.J. (2004) A systemic small RNA signaling system in plants. *The Plant Cell* 16: 1979–2000
- Yoo S.K., Chung K.S., Kim J., Lee J.H., Hong S.M., Yoo S.J., Yoo S.Y., Lee J.S., Ahn J.H. (2005) CONSTANS activates SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1 through FLOWERING LOCUS T to promote flowering in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 139: 770-778
- Zhao R., Dielen V., Kinet J.M., Boutry M. (2000) Cosuppression of a plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase isoform impairs sucrose translocation, stomatal opening, plant growth and male fertility. *The Plant Cell* 12: 535-546
- Zhou J., Theodoulou F., Sauer N., Sanders D., Miller A.J. (1997) A kinetic model with ordered cytoplasmic dissociation for SUC1, an *Arabidopsis* H<sup>+</sup>/sucrose cotransporter expressed in *Xenopus* oocytes. *Journal of Membrane Biology* 159: 113-125

Zhou L., Jang J.-C., Jones T.L., Sheen J. (1998) Glucose and ethylene signal transduction crosstalk revealed by an Arabidopsis glucose-insensitive mutant. PNAS 95: 10294–10299

Zrenner R., Salanoubat M., Willmitzer L., Sonnewald U. (1995) Evidence of the crucial role of sucrose synthase for a sink strength using transgenic potato plants (*Solanum tuberosum* L.). The Plant Journal 7: 97-107

# Anhang

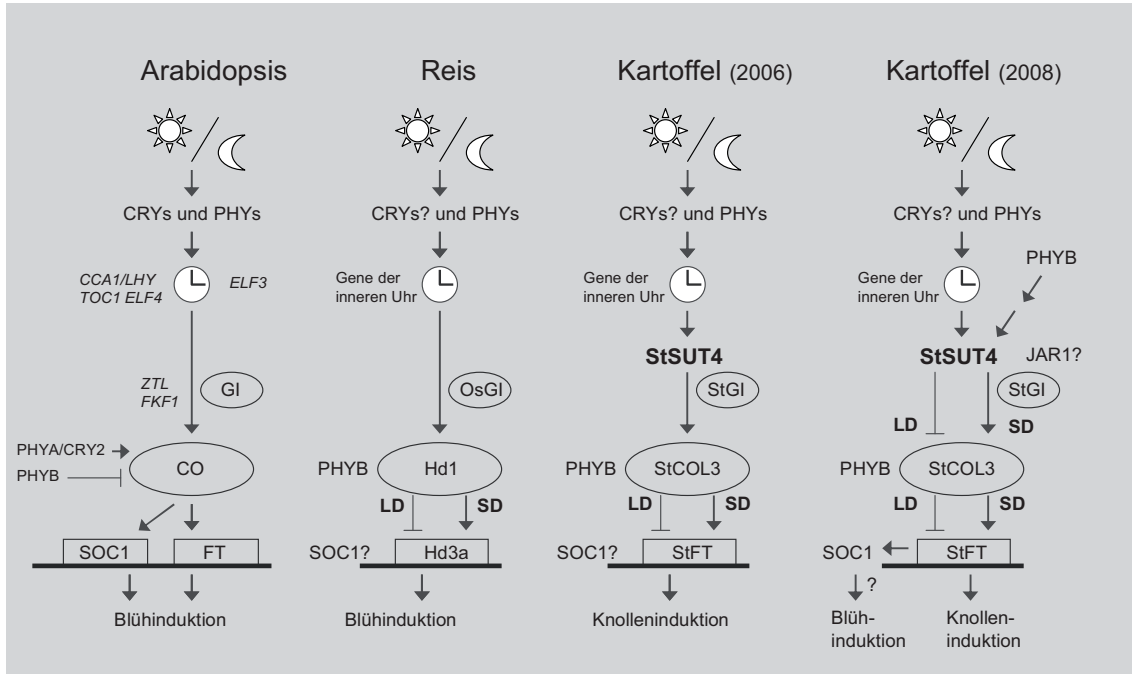


Abb.54: Aktuelles Modell der photoperiodischen Blühinduktion in Arabidopsis (LT-Induktion), Reis (KT-Induktion) und Kartoffeln (LT- Blühinduktion und KT-Knolleninduktion). Nach Rodriguez-Falcon *et al.*, 2006 verändert.

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich, dass meine Dissertation mit dem Thema „Untersuchung der physiologischen Funktion des Saccharosetransporters SUT4 in ausgewählten Solanaceen ” selbstständig verfasst wurde und die benutzte Literatur und Hilfsmittel vollständig angegeben wurden.

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mich bei der Entstehung dieser Arbeit unterstützt haben.

Ein großer Dank geht an Frau Dr. Christina Kühn für die engagierte Betreuung, viele interessante Diskussionen und ihre große Hilfsbereitschaft. Auch für ihre Unterstützung beim Korrekturlesen dieser Arbeit bin ich sehr dankbar.

Herzlich danken möchte ich Herrn Prof. Dr. Bernhard Grimm für die freundliche Aufnahme, Hilfsbereitschaft und interessante Ideen. Ich danke ihm sehr für kritische Anmerkungen zu Manuskripten und der vorliegenden Arbeit.

Besonderer Dank gilt Herrn Dr. Peter Geigenberger und den Mitarbeitern am MPI für Molekulare Pflanzenphysiologie in Golm für die Analysen der Kohlenhydraten und der AGPase Aktivität.

Ich möchte meinen Laborkollegen Dr. Undine Krügel, Dr. Angelika Mustroph, Hongxia He, Johannes Liesche, Olaf Czarnecki, Sridevi Damaraju, Hye-Jung Lee und allen, die die hier nicht namentlich aufgeführt wurden, herzlich für viele Hilfestellungen, Ratschläge und die schöne gemeinsame Zeit danken.

Für die Unterstützung beim Korrekturlesen dieser Arbeit bin ich besonders dankbar Dr. Undine Krügel, Dr. Angelika Mustroph, Dieter Hackenberg und Johannes Liesche.

Dieter Hackenberg danke ich für die Unterstützung bei der computergestützten Auswertung der real time PCR Daten.

Besonders herzlich danke ich Aleksandra Hackel für jede Hilfe, und ihre freundliche Unterstützung.

Den technischen Assistentinnen Barbara Hickel, Kersten Träder und Renate Kräft danke ich herzlich für ihre Hilfe.

Angelika Pötter danke ich für die hervorragende Pflege meiner Pflanzen.

Ganz besonders möchte ich auch Dr. Yvonne Pörs für die Photosynthese-Messung und viele Ratschläge danken

Ein großes Dankeschön geht an Ali Alawadi für die Hilfe bei der Interpretation der HPLC-Ergebnisse

Frauke Weiß und Sussane El-Badawi danke ich für die Hilfe bei organisatorischen Aufgaben

Der gesamten AG Pflanzenphysiologie danke ich für jede Hilfe und die Unterstützung

Der Stiftung Nachwuchsförderung danke ich für die Finanzierung meiner Promotion

## Publikationsliste

- Paper: Chincinska I.A., Liesche J., Krügel U., Michalska J., Geigenberger P., Grimm B., Kühn C. (2008) Sucrose transporter StSUT4 from potato affects flowering, tuberization, and shade avoidance response. *Plant Physiology* 146: 515-528.
- He H., Chincinska I., Hackel A., Grimm B., Kühn C. (2008) Phloem mobility and stability of sucrose transporter transcripts. *The Open Plant Science Journal* 2: 15-26.
- Krügel U., Reins J., Schulze W.X., Liesche J., Chincinska I., Grimm B., Kühn C. (2009) Identification of sucrose transporter StSUT1 interacting proteins by split ubiquitin and mass spectrometry revealed SUT1 association to lipid rafts in plants. Manuskript in Vorbereitung.
- Vortrag: Domanska I., HU Berlin (AG Grimm) (2005) Inhibition of a sink-specific sucrose transporter in *Solanum tuberosum*. XVI. Berliner Botanischer Graduierten-Kolloquium, „Havel-Spree-Kolloquium“
- Poster: Krügel U., Wiederhold E., Hackel A., Domanska I., Poolman B., Kühn C. (2005) Oligomeric state of the sucrose transporter StSUT1. 18. Tagung Molekularbiologie der Pflanzen Dabringhausen
- Domanska I., He H., Grimm B., Kühn C. (2006) StSUT4-RNAi plants do not show shade avoidance response. XV FESPB Congress Federation of European Societies of Plant Biology, Lyon Frankreich
- Krügel U., He H., Chincinska I., Grimm B., Kühn C. (2007) Homodimerization of the sucrose transporter StSUT1 induces targeting to lipid raft-like structures. XIV International Workshop Plant Membrane Biology, Valencia, Spanien
- He H., Krügel U., Chincinska I., Grimm B., Kühn C. (2007) Identification of SUT4-mRNA binding proteins. Botanikertagung, Hamburg



Chincinska I., Liesche J., He H., Krügel U., Rövert A., Kühn C. (2008) The sucrose transporter StSUT4 interconnects phytochrome and ethylene signaling. 21. Tagung Molekularbiologie der Pflanzen, Dabringhausen