

---

# Abstract

The complex trait of C<sub>4</sub> photosynthesis constitutes a convergent evolutionary adaptation of plants in response to unfavorable environmental conditions. The establishment of a CO<sub>2</sub> concentrating mechanism in C<sub>4</sub> species by complex biochemical and anatomical adaptations causes an increase in carbon assimilation rates and plant growth compared to C<sub>3</sub> photosynthetic plants. Enhanced plant growth largely influences the requirement for soil-derived mineral nutrients. Mineral plant nutrition, however, has scarcely been considered in connection with C<sub>4</sub> photosynthesis. The essential macronutrients sulfur and phosphorus are crucial for plant growth and development and preliminary studies in the genus *Flaveria* suggest metabolic differences in sulfate assimilation along the C<sub>4</sub> evolutionary trajectory. Therefore, this study aimed to identify and characterize metabolic adaptations of sulfur and phosphorus homeostasis in the evolution of C<sub>4</sub> photosynthesis.

Foliar accumulation of the reduced sulfur compounds cysteine and glutathione (GSH), increases with progressing establishment of a C<sub>4</sub> photosynthetic cycle. Enhanced demand for reduced sulfur, especially GSH, in C<sub>4</sub> *Flaveria* species is reflected in high rates of [<sup>35</sup>S]sulfate incorporation into GSH upon sulfate deprivation and increased GSH turnover as a reaction to the inhibition of GSH synthesis. Expression analyses indicate high significance of the  $\gamma$ -glutamyl cycle for GSH recycling in C<sub>4</sub> species. Sulfate reduction and GSH synthesis seem to be preferentially localized in the roots of C<sub>4</sub> species, which could be linked to its colocalization with the phosphorylated pathway of serine biosynthesis. Interspecies grafting experiments of *F. robusta* (C<sub>3</sub>) and *F. bidentis* (C<sub>4</sub>) confirmed high significance of the root system for the control of sulfate acquisition, GSH synthesis as well as sulfate and metabolite allocation in C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> plants.

Phosphate allocation shifts from predominant accumulation in the roots of C<sub>3</sub> *Flaveria* to high phosphate levels in the shoots of C<sub>4</sub> *Flaveria* species along the evolutionary trajectory. Increased accumulation of phosphate in the shoots could be associated with enhanced phosphate translocation rates in C<sub>4</sub>-like and C<sub>4</sub> species in [<sup>33</sup>P]phosphate feeding experiments. Increased expression of *PHO1* in C<sub>4</sub> roots seems to be the driving factor of increased phosphate translocation. Interspecies grafts of *F. robusta* and *F. bidentis* revealed that changes in phosphate allocation are under control of the shoot tissue and presumably depend on adapted systemic signaling between shoots and roots.

---

# Kurzzusammenfassung

C<sub>4</sub> Photosynthese ist eine komplexe Eigenschaft und eine konvergent-evolutionäre Anpassung von Pflanzen als Reaktion auf ungünstige Umweltbedingungen. Die Etablierung eines CO<sub>2</sub>-konzentrierenden Mechanismus in C<sub>4</sub> Arten durch komplexe biochemische und anatomische Veränderungen, bewirkt einen Anstieg der Kohlenstoffdioxidassimilationsrate und Zugewinn im Pflanzenwachstum im Vergleich mit C<sub>3</sub> photosynthetischen Pflanzen. Gesteigertes Pflanzenwachstum beeinflusst zu großen Teilen den Bedarf an bodenbürtigen Mineralien. Mineralische Pflanzenernährung im Zusammenhang mit C<sub>4</sub> Photosynthese ist jedoch bisher größtenteils unbeschrieben. Die essentiellen Makroelemente Schwefel und Phosphor sind kritisch für Pflanzenwachstum und -entwicklung, und vorausgehende Arbeiten in der Gattung *Flaveria* deuten auf metabolische Unterschiede in der Sulfatassimilation entlang der evolutionären Entwicklungsreihe von C<sub>4</sub> Pflanzen hin. Aus diesem Grund war es Ziel dieser Arbeit metabolische Anpassungen der Schwefel- und Phosphorhomöostase während der Evolution der C<sub>4</sub> Photosynthese zu identifizieren und zu charakterisieren.

Die Akkumulation der reduzierten Schwefelverbindungen Cystein und Glutathion (GSH) im Blatt steigt mit fortschreitender Entwicklung eines C<sub>4</sub>-Zyklus in der Gattung *Flaveria*. Der gesteigerte Bedarf an reduziertem Schwefel in C<sub>4</sub> *Flaveria* wird gestützt durch hohe Assimilationsraten von [<sup>35</sup>S]Sulfat in GSH als Reaktion auf Schwefelmangel und erhöhten GSH-Umsatz nach GSH-Synthese-Inhibition. Expressionsanalysen weisen weiter darauf hin, dass der  $\gamma$ -Glutamyl-Zyklus entscheidend am GSH-Recycling in C<sub>4</sub> Pflanzen beteiligt ist. C<sub>4</sub> Arten scheinen außerdem vorrangig GSH in den Wurzeln zu synthetisieren. Dies könnte im Zusammenhang mit gesteigerter Serin Synthese über den Phosphoserin Biosyntheseweg stehen. Die große Bedeutung des Wurzelsystems für die Kontrolle von Sulfataufnahme, GSH-Synthese und Sulfat- und Metabolitallokation in C<sub>3</sub> und C<sub>4</sub> Pflanzen, wurden durch interspezifische Pfropfungsexperimente mit *F. robusta* (C<sub>3</sub>) und *F. bidentis* (C<sub>4</sub>) bestätigt.

Phosphatallokation verändert sich von bevorzugter Akkumulation in den Wurzeln von C<sub>3</sub> *Flaveria* hin zu hohen Phosphatgehalten in den Sprossen von C<sub>4</sub> *Flaveria* Arten im Fortverlauf der evolutionären Entwicklungsreihe. Gesteigerte Phosphatakkumulation im Spross konnte durch [<sup>33</sup>P]Phosphat-Fütterungsexperimente mit einer erhöhten Phosphattranslokationsrate in C<sub>4</sub>-ähnlichen und C<sub>4</sub> Arten in Verbindung gebracht werden. Eine gesteigerte *PHOI*-Expression scheint dabei maßgeblich zu sein. Interspezifische Pfropfungen von *F. robusta* und *F. bidentis* zeigen desweiteren, dass die Unterschiede in Phosphatallokation unter der regulatorischen Kontrolle des Sprosses stehen und wahrscheinlich auf angepasste systemische Signale zwischen Spross und Wurzel angewiesen sind.