

**Transfer phloemmobiler Substanzen von Wirtspflanzen zum Parasiten *Cuscuta***

***reflexa***

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Frau Sophie Haupt

geb. am 31.05.1970 in Berlin

Gutachterin bzw. Gutachter:

1. Prof. Dr. Sauer
2. Prof. Dr. Krauss
3. Prof. Dr. Neumann

Halle (Saale), den 12. 9. 2001

## VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN

2,4-D	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure
ABA	Abscisinsäure
Abb.	Abbildung
AIB	$\alpha$ -Aminoisobuttersäure
Ala	Alanin
CF	Carboxyfluoreszein
CFDA	Carboxyfluoreszeindiacetat
DC	Dünnschichtchromatographie
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
GFP	green fluorescent protein
Glu	Glucose
Gly	Glyphosat
FM	Frischmasse
Fru	Fructose
HPTS	8-Hydroxypyren-1,3,6-Trisulfonsäure
HPTSA	8-Hydroxypyren-1,3,6-Trisulfonsäure-Acetat
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
IES	Indolylessigsäure
Leu	Leucin
LSC	Flüssigszintillationsverfahren
MCPA	Methylchlorphenoxyessigsäure
MES	Morpholinoethansulfonsäure
MOPS	3-N-Morpholinopropansulfonsäure
n	Anzahl der Einzelwerte
NADH	Nicotinamadenindinucleotiddehydrogenat
PVX	Kartoffel Virus X
rpm	Umdrehungen pro Minute
SE	Standardfehler mit 95% Konfidenzgrenzen
Sac	Saccharose
Tab.	Tabelle
Tris	2-Amino-2-Hydroxymethyl-1,3-Propandiol
W-P-S	Wirt-Parasit-System

## INHALTSVERZEICHNIS

	Seite	
1	EINLEITUNG	1
2	MATERIAL UND METHODEN	10
2.1	Anzucht und Kultivierung der Pflanzen	10
2.1.1	Der Parasit	10
2.1.2	Die Wirtspflanzen	10
2.1.3	Die Wirt-Parasit-Systeme	10
2.1.4	<i>Ricinus communis</i>	11
2.2	Einteilung der Wirt-Parasit-Systeme für die Aufarbeitung	14
2.3	Applikation der radioaktiv markierten Verbindungen	14
2.3.1	Applikation von $^{14}\text{CO}_2$	14
2.3.2	Applikation radioaktiver Lösungen durch Auftropfen auf die Blattspreite	15
2.3.3	Applikation radioaktiver Substanzen durch Injektion	15
2.3.4	Applikation radioaktiv markierter Lösungen an ausgestanzte Blattscheiben von <i>Ricinus communis</i>	16
2.3.5	Extraktion des Pflanzenmaterials	16
2.3.6	Radioaktivitätsmessung	16
2.4	Translokation von Fluoreszenzfarbstoffen	17
2.4.1	Herstellen der Farbstofflösungen	17
2.4.2	Applikation der Farbstoffe	17
2.4.3	Translokation von GFP	18
2.4.4	Anfertigen der Handschnitte	18
2.4.5	Konfokales Laser Scanning Mikroskop	18
2.5	Anfertigung der Semidünnschnitte	19
2.6	Dünnschichtchromatographie (DC)	19
2.7	Nachweis der Lokalisation radioaktiv markierter Verbindungen mit dem Phosphorimager	19
2.8	Bestimmungen von Enzymaktivitäten	20
2.8.1	Invertase	20
2.8.2	Saccharosesynthase (Susy)	21
2.8.3	ADP-Glucose-Pyrophosphorylase (AGPase)	22
2.9	Fraktionierung pflanzlicher Extrakte mittels Ionenaustauscher	23
2.10	Stärkeaufschluß	23

2.11	Translokation von Viren	23
2.11.1	Kartoffel Virus X	24
2.11.2	Inokulieren der Wirtspflanze	24
2.12	RNA-DNA-Methoden	25
2.12.1	RNA-Isolation aus dem Wirt-Parasit-System <i>N. benthamiana-C. reflexa</i>	25
2.12.2	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)	26
2.12.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	26
2.12.4	Agarose-Gelelektrophorese	27
2.13	Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen	27
2.13.1	Proteinaufarbeitung aus dem Wirt-Parasit-System <i>N. benthamiana-C. reflexa</i>	27
2.13.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	28
2.14	Western Blot (Immunodetektion)	28
2.14.1	Proteintransfer	28
2.14.2	Antikörperreaktion	29
2.15	Verwendete radioaktive Verbindungen	30
2.16	Auswertung der Ergebnisse	30
2.17	Begriffsdefinitionen	30
3	ERGEBNISSE	32
3.1	Untersuchungen zur Standardisierung des Versuchsystems <i>Pelargonium zonale – Cuscuta reflexa</i>	32
3.1.1	Translokation von <sup>14</sup> C-markierten Assimilaten in isolierten Blättern von <i>Pelargonium zonale</i>	32
3.1.2	Ermittlung der Zeitdauer für die Ausbildung eines funktionellen Phloemkontaktes zwischen Wirt und Parasit	33
3.1.3	Untersuchungen der source-sink Verhältnisse im Wirt-Parasit- System <i>Pelargonium – Cuscuta</i> bei Reduktion des Parasiten	35
3.2	Charakterisierung der in <i>Cuscuta</i> transportierten <sup>14</sup> C-Verbindungen	40
3.2.1	Dünnschichtchromatographische Analyse der Zuckerfraktion in einzelnen Abschnitten des Wirt-Parasit-Systems <i>Pelargonium- Cuscuta</i> nach Applikation von <sup>14</sup> C-Saccharose an die Spreite des Wirtes	43
3.3	Enzymbestimmungen	46
3.3.1	Bestimmung der Invertaseaktivität in definierten Abschnitten des W-P-S <i>Pelargonium-Cuscuta</i>	46

3.3.2	Bestimmung der zellwandgebundenen sauren Invertase, der löslichen sauren und löslichen neutralen Invertase im Wirt-Parasit-System <i>Pelargonium-Cuscuta</i> während der Ausbildung eines funktionellen Phloemanschlusses	50
3.3.3	Bestimmung der Aktivität von Saccharosesynthase und ADP-Glucose-Phosphorylase in der <i>Cuscuta</i> -Achse	53
3.4	Untersuchungen zur Selektivität des Übertritts von Substanzen aus dem Phloem des Wirtes in den Parasiten	54
3.4	Translokation von Farbstoffen, fluoreszierenden Viren und Proteinen	63
3.4.1	Nachweis des Phloemanschlusses von <i>Cuscuta</i> an <i>Nicotiana tabacum</i> Samsun und <i>Nicotiana benthamiana</i>	63
3.4.2	Untersuchungen zur Translokation phloemobiler Fluoreszenzfarbstoffe	64
3.4.3	Untersuchungen zur Translokation des Kartoffel Virus X.GFP im Wirt-Parasit-System <i>Nicotiana benthamiana-Cuscuta reflexa</i>	71
3.4.4	Untersuchungen zur Translokation von GFP (green fluorescent protein) im Wirt-Parasit-System <i>Nicotiana tabacum</i> cv. Sumsai At-SUC II- <i>Cuscuta reflexa</i>	75
4	TABELLENVERZEICHNIS	79
5	DISKUSSION	86
5.1	Methodische Aspekte	86
5.2	Zur sink Stärke von <i>Cuscuta</i>	89
5.3	Zur Rolle der Invertase während der Infektion und beim Übertritt der Saccharose	92
5.4	Selektivität des Übertritts	94
5.5	Translokation von Viren	98
5.6	Translokation von Fluoreszenzfarbstoffe	100
5.7	Translokation von GFP	103
5.8	Unser Modell für den Übertritt	104
6	ZUSAMMENFASSUNG	108
7	LITERATURVERZEICHNIS	111

## 1 EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

In Höheren Pflanzen werden Umfang und Richtung des Phloemstromes durch die Wechselwirkungen zwischen „source,- und „sink,-Regionen bestimmt, die für jedes Entwicklungsstadium charakteristisch sind. Unter einem „source,, verstehen wir Orte, die in der Lage sind, mehr Assimilate zu bilden oder zu remobilisieren als sie selbst für Wachstum und Stoffwechsel benötigen. Dieser Überschuß wird ins Phloem beladen, um zur Versorgung anderer Teile beizutragen. Zu Beginn der pflanzlichen Entwicklung bilden die Speicherkotyledonen oder –endosperme in den Samen den „source,,. Später übernehmen die photosynthetisch aktiven Blätter diese Rolle. „Sinks,, sind Orte des Assimilatverbrauchs oder der Speicherung, die auf die Versorgung durch die „sources,, angewiesen sind, also junge wachsende und sich differenzierende Gewebe und Speichergewebe, wie sich entwickelnde Blätter, Blüten, Früchte, Samen oder Überdauerungsorgane. In sie werden die Assimilate aus dem Phloem entladen und anschließend metabolisch umgewandelt.

Der entwicklungsbiologische Übergang vom „sink,, zum „source,, ist fließend, wie am Beispiel von *Cucurbita pepo* - (TURGEON & WEBB, 1973) und *Nicotiana tabacum*-Blättern (OPARKA et al., 1999) gezeigt werden konnte.

„Source,, und „sink,, stehen über die Leitelemente des Phloems in Verbindung. In jeder Pflanze konkurrieren verschiedene „sinks,, untereinander um die in den „sources,, gebildeten Assimilate. Der Anteil der in die jeweiligen „sinks,, transportierten Assimilate hängt von deren Stärke – dem Produkt aus ihrer Größe und ihrer metabolischen Aktivität - ab.

Die Entladung von Assimilaten in „sinks,, kann auf zwei Wegen erfolgen: Symplastisch oder apoplastisch (PATRICK, 1990). Voraussetzung für eine symplastische Entladung ist das Vorhandensein von Plasmodesmen zwischen Leitgewebe und umgebendem Gewebe. Die Assimilate werden über Plasmodesmen aus den Siebröhren direkt zu den Verbrauchsorten, den „sinks,, transportiert. So erfolgt die Entladung von Assimilaten in Wurzelspitzen (SCHULZ, 1995; OPARKA et al., 1994), sich entwickelnde Blätter (HAUPT et al., 2000; SCHMALSTIG & GEIGER, 1985; TURGEON, 1987) und Kartoffelknollen (OPARKA & PRIOR, 1988) vorwiegend symplastisch.

Fehlen Plasmodesmen zwischen dem Phloem und dem umgebenden Gewebe, erfolgt die Entladung apoplastisch. Dabei werden die Assimilate zunächst aus dem Phloem in den extrazellulären Raum, den Apoplasten, abgegeben und anschließend aus ihm über spezifische Carriersysteme von den Zellen des „sinks,, aufgenommen. Speichergewebe, wie Wurzeln und Samen stellen Beispiele für eine apoplastische Entladung dar. Dabei werden die entladenen Kohlenhydrate meist in Form von Stärke in den Zellen deponiert. Für diese Form des Transfers von Saccharose werden zwei Möglichkeiten diskutiert: Im ersten Fall wird die

aus dem Phloem in den Apoplasten abgegebene Saccharose ohne metabolische Veränderung im Apoplasten durch einen Protonen-Co-Transport in die Zellen des „sinks“, aufgenommen und in ihnen durch Saccharose-Synthase zu Monosacchariden umgesetzt, die in die verschiedenen Stoffwechselwege einfließen.

Im zweiten Fall wird Saccharose im Apoplasten von einer zellwandgebundenen sauren Invertase in die Monosaccharide Glucose und Fructose gespalten, die anschließend über Carriersysteme in die Zellen aufgenommen werden. Die Rolle der extrazellulären sauren Invertase bei der apoplastischen Phloementladung wird kontrovers diskutiert. Nach ESCHRICH und ESCHRICH (1992) stellt sie das Schlüsselenzym für die apoplastische Entladung dar, welches durch die Spaltung von Saccharose in die Monosaccharide Glucose und Fructose einen beständigen Konzentrationsgradienten zwischen Phloem und Apoplasten aufrechterhält sowie eine Rebelastung von Saccharose in die Siebröhre verhindert. Die Spaltung von Saccharose ist auf diese Weise die treibende Kraft der Phloementladung. Außerdem entsteht ein hohes osmotisches Potential im Apoplasten, das zu einem verstärkten Phloemstrom in Richtung „sink“, führen soll.

Eine Invertasebeteiligung wird für die apoplastische Entladung entlang des path in Blattstielen bzw. Sproßachsen von Sellerie (KELLER & MATILE, 1989), beim apoplastischen Transport von Zuckern zwischen dem Gametophyten und dem Sporophyten bei *Polytrichum* (RENAULT et al., 1990) und für Luftwurzeln von *Monstera* (ESCHRICH, 1980) diskutiert. Für diese Gewebe, die durch eine bevorzugte Aufnahme von Glucose und Fructose durch die angrenzenden Parenchymzellen bei sehr geringer bzw. fehlender Saccharose-Aufnahme charakterisiert sind, scheint die Spaltung der Saccharose durch Invertase eine notwendige Voraussetzung für den Stoffübertritt darzustellen. Dagegen konnte für Internodien von Zuckerrohr gezeigt werden, daß Saccharose nach der Entladung in den Apoplasten ungespalten von den Speicherparenchymzellen aufgenommen wird (THOM & MARETZKI, 1992) und die im Apoplasten auftretende Invertase in keinem Zusammenhang mit der apoplastischen Entladung steht (LINGLE, 1989).

VAN BEL (1992 a) kombiniert hohe Aktivitätsniveaus von zellwandgebundener saurer Invertase in jungen Geweben grundsätzlich mit einer symplastischen Entladung. Dies wird unterstrichen durch die Tatsache, daß hohe Aktivitäten von zellwandgebundener saurer Invertase oft in schnell wachsendem Gewebe, wie jungen Blättern und Wurzeln in Kombination mit symplastischer Phloementladung gefunden wurden (STURM et al., 1995).

Ein weiteres Beispiel für einen apoplastischen Kohlenhydrattransport unter Beteiligung von Invertase stellt die Aufnahme von Assimilaten aus der Samenschale von Leguminosen in den symplastisch isolierten Embryo dar (WEBER et al., 1995 a/b; 1997 a/b). Sowohl die eigentliche Entladung aus dem Phloem in das umliegende Gewebe als auch der sich anschließende

Transport im „mütterlichen Gewebe„ erfolgen symplastisch. Für den Übergang der Assimilate zum Embryo müssen diese aus der Samenschale in die endospermale Höhle abgegeben werden. In den Zellwänden der Samenschale befindet sich eine extrazelluläre saure Invertase, welche Saccharose spaltet. Die entstehenden Monosaccharide werden anschließend über spezifische Carrier vom Embryo aufgenommen.

Bei der Ausbildung der bisher beschriebenen „sinks„ handelt es sich immer um die Realisierung eines entwicklungsbiologisch festgelegten Musters. Im Gegensatz dazu stehen induzierte „sinks„, welche durch Infektion mit pflanzlichen und tierischen Parasiten, Pilzen oder Bakterien hervorgerufen werden. Durch die Infektionen werden die Parasiten neben den wirtseigenen „sinks„ zu Attraktionszentren für die im Wirt gebildeten Assimilate. Die Entladung in diese induzierten „sinks kann sowohl symplastisch als auch apoplastisch erfolgen.

Bei Infektion von *Kalanchoë daigremontiana* und *Ricinus communis* mit dem tumorbildenden *Agrobacterium tumefaciens* findet ein symplastischer Übertritt der Assimilate aus dem Phloem des Wirtes in das Tumorgewebe statt (PRADEL et al., 1996), welcher unabhängig von der dort gemessenen hohen Aktivität der extrazellulären sauren zellwandgebundenen Invertase ist. In diesen Wirt-Parasit-Systemen kommt es zur Ausbildung von Plasmodesmen zwischen dem Tumor und dem angrenzenden Wirtsgewebe. Eine „sink„-Induktion findet ebenfalls statt, wenn Wurzeln von *Arabidopsis thaliana* von dem Wurzelnematoden *Heterodera schachtii* befallen werden. Es konnte gezeigt werden, daß das vom Parasiten induzierte, vom Wirtsgewebe symplastisch isolierte Syncytium als ein Haupt-„sink„ für die zu entladenen Assimilate fungiert (BÖCKENHOFF et al., 1996). Da zwischen dem Wirtsgewebe und dem Syncytium keine symplastische Verbindung in Form von Plasmodesmen vorhanden ist, muß angenommen werden, daß die Entladung von Assimilaten apoplastisch erfolgt. Beim Befall von *Hordeum distichum* L. mit dem braunen Rostpilz *Puccinia hordeii* (TETLOW & FARRAR, 1993) erhöhen die interzellulär wachsenden Pilzhyphen den apoplastischen pH von 6,6 auf 7,3 und verhindern dadurch eine effektive Rückladung der Saccharose ins Wirtsgewebe. Die ausgetretene Saccharose wird von einer pilzeigenen Invertase gespalten und die dabei entstehende Glucose durch die Hyphen aufgenommen.

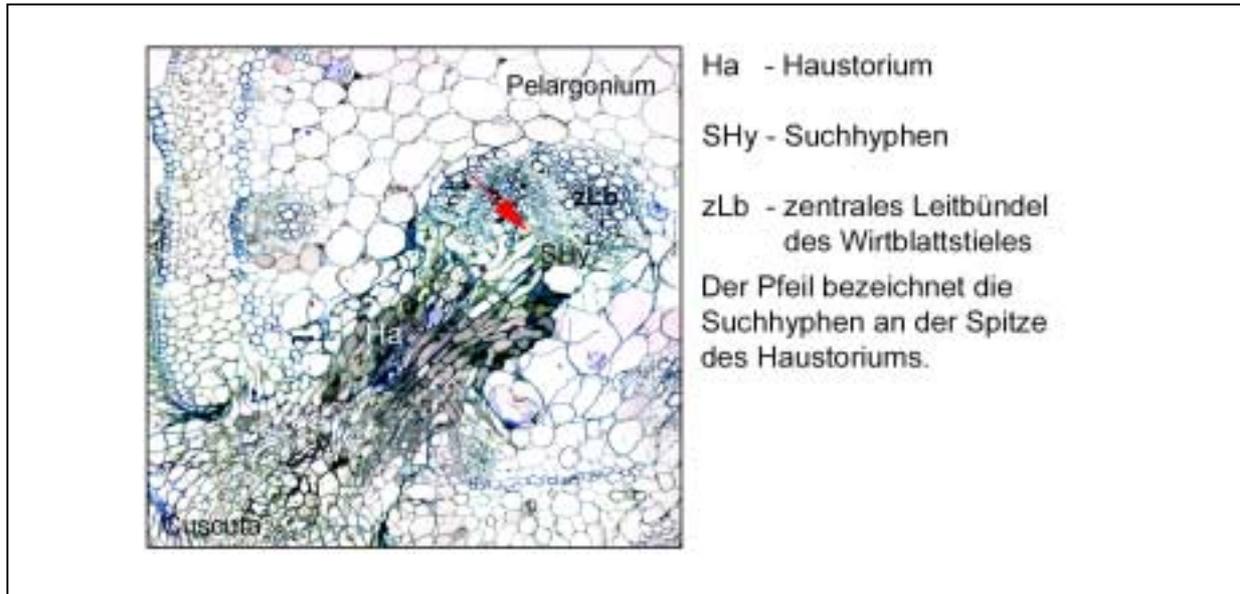
Auch die parasitische Blütenpflanze *Cuscuta reflexa* ROXB: induziert bei Infektion von anderen Höheren Pflanzen einen sink. 1744 wurde erstmals durch GUETTARD über die Entwicklung und Anatomie der Haustorien von *Cuscuta* berichtet. Auch andere Forscher (VON MOHL, 1827; KOCH, 1874) waren fasziniert von dem zu den *Convolvulaceen* gehörenden Holoparasiten, der durch die Rückbildung seiner Wurzel, rudimentären, schuppenförmigen Blättern und einer sehr geringen Photosyntheseaktivität (MACHADO & ZETSCHKE, 1990; HIBBERD, et al., 1998) in seiner Ernährung vollständig auf Wirtspflanzen angewiesen ist. Um sich mit Assimilaten, Wasser und darin gelösten Nährsalzen zu versorgen, umwindet der

Parasit die jeweilige Wirtspflanze und bildet spezielle Organe, sogenannte Haustorien, aus, mit denen er in den Wirt eindringt und einen direkten Kontakt zu dessen Leitbündeln herstellt. Die Aufnahme der aus den Wirtssiebröhren austretenden Verbindungen stellt den zentralen Prozeß im Stoffwechsel von *Cuscuta* dar und ist äußerst effektiv. Bei der Parasitierung der Wirtspflanze bildet *Cuscuta* einen starken „sink,, der die wirtseigenen „sinks,, wie junge Blätter, Blüten und reife Früchte an Attraktivität übertrifft (JACOB & NEUMANN, 1968; SUTHOF, 1968; WOLSWINKEL, 1974), so daß die Wirtspflanze innerhalb weniger Wochen an Nährstoffmangel stirbt. Bei Translokationsexperimenten am Wirt-Parasit-System *Vicia faba*-*Cuscuta reflexa* konnte gezeigt werden, daß bereits 5 Stunden nach Applikation von <sup>14</sup>C-Saccharose an „source,,-Blätter des Wirtes 50% der aufgetragenen <sup>14</sup>C-Saccharose in den Parasiten transportiert wurden (JACOB & NEUMANN, 1968). JESCHKE et al. (1994 a,b) fanden bei ihren Experimenten mit dem Wirt-Parasit-System *Lupinus albus*-*Cuscuta reflexa*, daß der Parasit dem Wirt 81% der Photosyntheseprodukte und allen vom Wirt fixierten und Teile des in Speichern der Wirtspflanze eingebauten Stickstoffs entzieht. Unter dem Einfluß der Parasitierung findet eine bedeutende Steigerung der Photosyntheseleistung des Wirtes statt (JESCHKE et al., 1995), um den Assimilatentzug durch den Parasiten zu kompensieren.

1893 stellte PEIRCE in seiner Abhandlung über die Struktur der Haustorien phanerogamer Parasiten erstmals die Frage nach der Art des Phloemanschlusses von *Cuscuta*-Arten an ihre Wirtspflanzen. Im Gegensatz zum Xylem, wo ein direkter Anschluß des Parasiten an die Wirtspflanze klar zu erkennen war, und auch durch spätere Arbeiten immer wieder bestätigt wurde (KINDERMANN, 1928; DÖRR, 1969), war eine offene symplastische Phloemverbindung nicht zu erkennen. Auch SCHUMACHER und HALBSGUTH (1938) konnten bei ihren Translokationsexperimenten mit fluoreszierenden Farbstoffen im Lichtmikroskop keine direkte Verbindung zwischen *Cuscuta*-Hyphenzelle und Wirtssiebröhre finden.

Die umfassendsten licht- und elektronenmikroskopischen Untersuchungen zur Anatomie der *Cuscuta*-Haustorien führte DÖRR (1968, 1969, 1972) an *Cuscuta odorata* durch, welche auch die gesamte Kompliziertheit des Problems verdeutlichten. Nach Umwinden eines kompatiblen Wirtes bildet der Parasit in den kontaktreizbaren Achsenbereichen Haustorien aus, die keilförmig in das Wirtsgewebe hineinwachsen, um einen Kontakt zu den Leitbündeln des Wirtes herzustellen. Die Mechanik des Vordringens der Parasitenzellen im Wirtsgewebe ist eine Kombination aus einfachen Druckmechanismen und enzymatischen Prozessen. In elektronenmikroskopischen Aufnahmen sichtbare Auflösungserscheinungen im Bereich der Mittellamellen und Primärwände der Wirtszellen sowie eine nachgewiesene hohe Aktivität von Methylesterasen (SRIVASTAVA et al., 1994) sprechen für die Beteiligung von Enzymen an diesem Prozeß.

In den tieferen Rindenschichten des Wirtes kommt es zu einer Aufgliederung des apikalen Haustorialbereiches in einzelne hyphenartige Zellstränge. Diese sogenannten „Suchhyphen“, breiten sich sowohl intra- als auch interzellulär im Wirtsgewebe aus und versuchen durch überproportionales Längenwachstum einen Kontakt an das Leitgewebe des Wirtes herzustellen (siehe Abb.1.1).



**Abb.1.1: Wirt-Parasit-System *Pelargonium zonale-Cuscuta reflexa*  
 Querschnitt durch einen mit *Cuscuta* parasitierten Blattstiel von *Pelargonium zonale* 10 Tage nach Ansetzen des Parasiten.**

Die Hyphenspitze ist dabei stets von einer eigenen Wand umgeben. Untersuchungen zur Feinstruktur der Spitzen dieser Hyphenzelle ergaben, daß sich in den Zellwänden Plasmodesmen befinden, die die Symplasten von Wirt und Parasit direkt miteinander verbinden. Diese plasmatischen Verbindungen bleiben jedoch nur solange bestehen, bis vom Wirt eine sekundäre Wand gegen die Hyphe abgelagert wird.

Trifft die Spitze der Suchhyphe auf eine Siebröhre des Wirtes und erkennt sie als solche, beginnt ein sehr spezieller Prozeß der Differenzierung. Die Hyphenzelle legt sich wie "die Finger einer Hand" (DÖRR, 1972) um die Wirtssiebröhre. Es kommt zu einer Auflockerung des Grundplasmas, der Auflösung des Tonoplasten und der Degeneration des Kernes. Anschließend ist der Verlust von Ribosomen und Dictyosomen zu beobachten. Im direkten Kontaktbereich der Hyphenzellwand zur Wirtssiebröhre werden Wandprotuberanzen ausgebildet, die die Oberfläche um das 6-20fache vergrößern. Damit nimmt die Suchhyphe Eigenschaften von sogenannten Transferzellen (GUNNING, 1977) an, die bei Höheren Pflanzen stets dort gebildet werden, wo intensive Transportprozesse stattfinden. Feinstrukturell zeigt die parasitäre Absorptionshyphe mit dem Verlust des Tonoplasten und des Zellkerns aber auch wesentliche Merkmale einer Siebröhre.

Im Falle des Xylemkontaktes entwickelt sich die Parasitenzelle, je nach Wirtselementverbindung, zum Tracheenelement oder zur Tracheide, wobei beide Zellen sich synchron differenzieren. Das bedeutet, daß analog der Verhältnisse bei einer Propfung, (SCHULZ, 1998), der Anschluß der Parasitenzelle nur an ein vom Wirt neugebildetes Leitelement gleichen Differenzierungsstadiums erfolgen kann. Gleichzeitig kommt es im Haustorium zur Ausbildung von Phloemelementen, die sich aus Parenchymzellen differenzieren. Im Gegensatz zu Hemiparasiten existiert keine Parenchymbrücke, sondern eine kontinuierliche Verbindung von Wirt- und Parasitenphloem (KOLLMANN & DÖRR, 1969, ISRAEL et al., 1980). Allerdings konnten trotz sorgfältiger elektronenmikroskopischer Untersuchungen an der direkten Kontaktstelle zwischen Wirt und Parasit bisher keine symplastischen Verbindungen gefunden werden (DÖRR, 1996).

Wegen des Fehlens von Plasmodesmen zwischen dem Phloem des Wirtes und der Absorptionshyphe des Parasiten wird eine apoplastische Entladung der Assimilate aus der Wirtssiebröhre in den sink *Cuscuta* diskutiert.

Dieser Vorgang müßte die folgenden Teilprozesse umfassen:

1. Austritt der im Phloem des Wirtes transportierten Verbindungen in den von Wirt und Parasit gemeinsam gebildeten Apoplasten,
2. Diffusion der Substanzen durch den Apoplasten, wobei eine Spaltung von Saccharose durch extrazelluläre Invertase denkbar ist, und
3. die Aufnahme der Substanzen bzw. ihrer Metabolite durch die Hyphenzelle.

Der erste Schritt, der Efflux der Substanzen aus den Siebröhren, erfordert eine lokal begrenzte Erhöhung der Permeabilität der Siebröhrenmembran, die nach den Vorstellungen der Druckstromhypothese (MÜNCH, 1930) entlang des „path,“ unter physiologischen Bedingungen als sehr wenig permeabel angenommen wird.

Für die Realisierung dieses Prozesses wurden verschiedene Denkmodelle entwickelt. So ging man in den 70er Jahren von einem stofflichen Prinzip aus, welches entweder die Permeabilität der Wirtssiebröhre erhöhen oder die für das Retrieval der Saccharose notwendigen Carrier hemmen sollte. Dabei wurde auch die Beteiligung von Phytohormonen wie z.B. Cytokininen (JACOB et al., 1975) oder Abscisinsäure (DE BOCK & FER, 1992) diskutiert. Für letzteres Phytohormon sind aus anderen Untersuchungen sowohl Einflüsse auf die Beladung (VREUGDENHIL, 1983) als auch auf die Entladung des Phloems (TANNER, 1980) bekannt.

Eine weitere Hypothese geht von einer spezifischen Entladung der Wirtssiebröhre an der Kontaktstelle in den apoplastischen Raum aus. WOLSWINKEL (1973, 1977) schloß aus seinen Effluxuntersuchungen an mit *Cuscuta europaea*, *C. campestris* und *C. lupuliformis* parasitierten Achsen von *Vicia faba*, daß die Entladung der Siebröhre durch spezifische

Carrier erfolgt und metabolisch kontrolliert wird (WOLSWINKEL & AMMERLAAN, 1983). Seine Vorstellungen über den Stofftransfer zwischen Wirt und Parasit lehnen sich an das von ESCHRICH (1980) entwickelte Modell der apoplastischen Phloementladung mit Beteiligung einer extrazellulären Invertase an. Die aus der Siebröhre austretende Saccharose soll durch Spaltung mittels extrazellulärer saurer Invertase an einer Rückladung gehindert werden und Glucose und Fructose über spezifische Monosaccharidcarrier in die Hyphenzelle des Parasiten aufgenommen werden. Untersuchungen von STROBEL et al. (1969) und WOLSWINKEL (1977) ergaben Hinweise auf eine erhöhte Invertase-Aktivität in den Wirt-Parasit-Systemen im Vergleich zu nicht infizierten Pflanzen. Während WOLSWINKEL (1977) aus seinen Ergebnissen schließt, daß die Erhöhung der Invertase-Aktivität durch *Cuscuta* erfolgt, vertreten STROBEL et al. (1969) die Auffassung, daß in den infizierten Pflanzen die Aktivität der wirtseigenen Invertase erhöht ist.

Ob Invertase überhaupt an dem Transfer von Saccharose beteiligt ist, erscheint nach den bisher vorliegenden Ergebnissen völlig ungeklärt. SAMODELKIN (1990) konnte nachweisen, daß der Invertase-Inhibitor Anilin keinerlei Einfluß auf die Translokation <sup>14</sup>C-markierter Assimilate aus dem Wirt *Vicia faba* in den Parasiten *Cuscuta reflexa* besitzt. Auch TSIVION (1978 b) vertritt die Auffassung, daß nach einer spezifischen Entladung der Wirtssiebröhre Saccharose ungespalten in den Parasiten übertritt. Welche Prozesse sich an der Übergangsstelle zwischen Wirt und Parasit abspielen, wurde bisher auf Grund der schwierigen experimentellen Zugänglichkeit dieser, nur auf wenige Zellen beschränkten Zone kaum untersucht. Experimente mit auf verschiedene Weise „isolierten Haustorien,“ ergaben widersprüchliche Ergebnisse. So fanden BOUYA (1986) und DE BOCK (1990) für aus dem Wirtsgewebe herausgeschnittenen Sproßachsen-Scheiben mit Haustorien eine bevorzugte Aufnahme von Saccharose gegenüber Glucose. Dagegen stellten STROBEL (1970) und JACOB et al. (1968) für ihre aus dem Wirtsgewebe herausgezogenen „Haustorialzapfen,“ eine extrazelluläre Spaltung der Saccharose und die bevorzugte Aufnahme der Monosaccharide fest. Bei beiden Versuchsvarianten ist es jedoch fraglich, inwieweit diese Gewebe, die durch die Präparation der Haustorien viele Wundflächen und sicher auch Verletzungen der Hyphenzellen aufweisen, tatsächlich eine Aufnahme in die Haustorien widerspiegeln.

JESCHKE et al. (1995, 1997) gehen auf Grund ihrer Untersuchungen zu „sink,“-Stärke, -charakter und der Verschiebung des N/C-Quotientens innerhalb des Wirt-Parasit-Systems *Ricinus communis* – *Cuscuta reflexa* während der Parasitierung von einem selektiven Übertritt von Substanzen aus dem Wirt in den Parasiten aus. Gegen eine solche Selektivität sprechen Experimente, bei denen festgestellt wurde, daß auch Substanzen, die für den Stoffwechsel des Parasiten nicht verwertbar sind und ihn in einigen Fällen sogar schädigen, wie Farbstoffe (SCHUMACHER, 1934), Quinolizidin-Alkaloide (BÄUMEL, 1995) und Digitalisglycoside (ROTHE et al., 1999) sowie Wirkstoffe von Pflanzenschutzmitteln (JAHNKE, 1975; BIGALKE, 1975; HAUPT &

NEUMANN, 1996) vom Phloem des Wirtes in *Cuscuta* gelangen. Diese Ergebnisse lassen eher eine durch *Cuscuta* induzierte unspezifische Erhöhung der Permeabilität der Siebröhre an der Kontaktstelle zwischen Wirt und Parasit vermuten.

Einige Ergebnisse lassen auch Zweifel an der aufgrund des fehlenden Nachweises von Plasmodesmen postulierten apoplastischen Entladung aufkommen. Bereits 1934 veröffentlichte SCHUMACHER eine Arbeit über den Übertritt des Farbstoffes Fluoreszein aus den Siebröhren der Wirtspflanze in den Parasiten *Cuscuta*, wobei seinen Angaben nach der Farbstoff die gesamte Zeit über im Cytoplasma verblieb. Dies stellt zugleich den ersten Bericht über die Translokation einer xenobiotischen Substanz aus dem Phloem des Wirtes in das des Parasiten dar. BENNETT (1940) konnte nachweisen, daß *Cuscuta*-Arten in der Lage sind, Viren zu übertragen. Es ist bekannt, daß Viren symplastisch in den Wirtspflanzen wandern - also der Transport von Zelle zu Zelle durch die Plasmodesmen stattfindet. Für den Langstreckentransport werden sie am „source“, in das Wirtspfloem symplastisch beladen, passiv im Phloem des Wirtes mit den strömenden Assimilaten mitgerissen und dann an den „sink“-Orten symplastisch entladen (ROBERTS et al., 1997).

Trotz der vorliegenden Fülle von Ergebnissen zur Morphologie und Physiologie des Leitgewebeanchlusses des Holoparasiten *Cuscuta* an seine Wirtspflanzen ist es bisher nicht gelungen, eine befriedigende Antwort auf die Frage nach dem Charakter des Phloemanschlusses zu finden. Der Übertritt der Assimilate stellt nach wie vor ein ungeklärtes transportphysiologisches Phänomen dar.

Es war Aufgabe der vorliegenden Arbeit, den vielen zum Teil sich auch widersprechenden Fakten nachzugehen und den Übertritt von Substanzen aus dem Phloem des Wirtes in den Parasiten hinsichtlich seiner Selektivität und des Transportweges zu charakterisieren.

Dabei wurden folgende Teilprobleme bearbeitet:

1. Untersuchungen des Assimilattransportes zwischen Wirt und Parasit im Verlauf der Haustorienentwicklung
2. Untersuchungen zur „sink“-Stärke von *Cuscuta*,
3. Untersuchungen zum Metabolismus der Kohlenhydrate ,
4. Untersuchungen zur Enzymaktivität verschiedener Invertasen während der Ausbildung des Phloemkontaktes,
5. Untersuchung zur Selektivität des Übertritts von Substanzen aus dem Wirt in den Parasiten,
6. Untersuchungen zur Translokation von Viren, Fluoreszenzfarbstoffen und des green fluorescent proteins (GFP).

Als Untersuchungsobjekte wurden mit *Cuscuta reflexa* Roxb. parasitierte Pflanzen von *Pelargonium zonale* L., *Nicotiana benthamiana* L. und *Nicotiana tabacum* L. ausgewählt.

## **2 MATERIAL UND METHODEN**

### **2.1 Anzucht und Kultivierung der Pflanzen**

#### **2.1.1 Der Parasit**

Die bei allen Experimenten eingesetzten Sproßachsen von *Cuscuta reflexa* Roxb. waren vegetativ vermehrte Nachkömmlinge der von Prof. Dr. O. H. VOLK (Universität Würzburg) 1959 aus Afghanistan eingeführten und seit 1961 im Gewächshaus des Institutes für Pflanzen- und Zellphysiologie kultivierten Pflanzen. Als Wirtspflanze für die Stammkultur diente *Pelargonium zonale*. Um das Blühen des Parasiten zu verhindern, wurde die Kultur ganzjährig unter Langtagbedingungen (16 h Licht, 8 h Dunkelheit) gehalten (JACOB, 1966). Von November bis März erfolgte eine Zusatzbeleuchtung mit Quecksilberhochdruckdampflampen (HQL 250, Berliner Glühlampenwerke). Im Sommerhalbjahr entsprachen Luftfeuchte und Temperatur den natürlichen Bedingungen. Im Winterhalbjahr schwankte die Temperatur des Gewächshauses zwischen 20-25°C, die Luftfeuchte betrug zwischen 60 und 80 %.

#### **2.1.2 Die Wirtspflanzen**

*Nicotiana benthamiana* und *N. tabacum* cv. Samsun wurden aus Samen in einem Gemisch aus Torf und Sand (3 : 1) angezogen. Die adulten *Pelargonium zonale* Pflanzen waren kommerzieller Herkunft. Alle Wirtspflanzen wurden im Gewächshaus unter den gleichen Bedingungen wie der Parasit gehalten (2.1.1).

#### **2.1.3 Die Wirt-Parasit-Systeme**

Für die Parasitierung der Wirtspflanzen *Pelargonium zonale*, *Nicotiana benthamiana* und *N. tabacum* wurden von der Stammkultur abgetrennte Sproßachsen von *Cuscuta reflexa* benutzt. Die isolierten Achsen waren 35-40 cm lang und durchschnittlich 3-4 mm dick. Zur Ausbildung von Haustorien und damit zur Infektion von Wirten ist die Achse nicht in ihrer gesamten Länge, sondern nur der zwischen 1 und 6 cm von der Spitze entfernte Achsenabschnitt in der Lage. Dieser, im folgenden als „kontaktreizbarer Bereich“, bezeichnete Teil der Achse wurde in Abhängigkeit vom angestrebten Induktionsmodus in unterschiedlicher Weise an dem zu parasitierenden Abschnitt der Wirtspflanze fixiert.

#### „Gewundener,, Induktionsmodus

Bei diesem, den natürlichen Bedingungen entsprechenden Induktionsmodus wurde der kontaktreizbare Bereich in zwei Linkswindungen um den zu parasitierenden Bereich des Wirtes gelegt und mit Klebeband fixiert (Abb.2.1 B). Um die Parasitierung auf einen definierten Bereich des Blattstieles bzw. der Sproßachse der Wirtspflanze zu begrenzen, wurden die Abschnitte oberhalb und unterhalb des zu parasitierenden Bereiches mit einer Manschette aus Klebeband abgedeckt. Der in der Regel nach 14 Tagen erfolgreiche Anschluß des Parasiten war äußerlich am Austritt von Zuckertropfen an den Nektarien der *Cuscuta*-Achse und einem täglichen Zuwachs des Parasiten von mehr als 7cm zu erkennen.

#### „Paralleler,, Induktionsmodus

Bei diesem Induktionsmodus wurde das Winden des Parasiten um die Organe des Wirtes experimentell unterdrückt und eine Anordnung der Haustorien ausschließlich an *einer* Flanke des Blattstiels oder der Sproßachse erzwungen. Dazu wurde der kontaktreizbare Bereich durchgehend mit einem inerten Klebeband an einer Flanke des zu parasitierenden Abschnitts des Wirtes befestigt und leicht angedrückt. Anlagen von *Cuscuta*-Seitensprossen wurden vorher sorgfältig mit der Rasierklinge entfernt, um ein lückenfreies Anliegen zu gewährleisten. Wie beim „gewundenen,, Induktionsmodus war nach 14 Tagen die Verbindung zwischen Wirt und Parasit über untereinander in einer Reihe angeordnete Haustorien, voll funktionsfähig (Abb.2.1 AA).

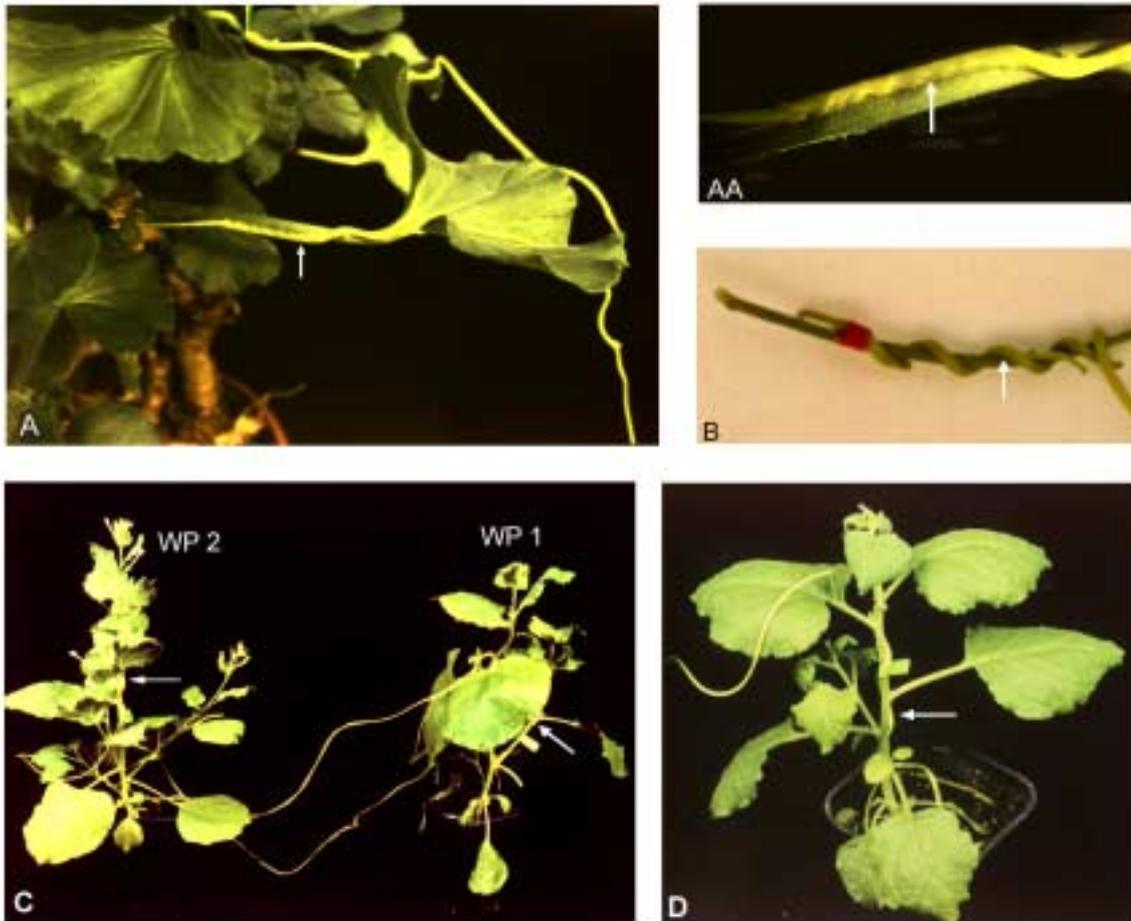
#### „Brücken,,-Infektion

Für die Untersuchung der Translokation von Viren wurden zwei Pflanzen von *Nicotiana benthamiana* über eine *Cuscuta*-Achse miteinander verbunden (Abb.2.1 C).

Dazu wurden zunächst 6 bis 8 Wochen alte Pflanzen an den Blattstielen der unteren source-Blätter mit *Cuscuta* im „gewundenen,, Modus parasitiert. Hatte der Zuwachs der *Cuscuta*-Achse 25-30cm erreicht, das war nach 5 -7 Tagen der Fall, wurde ihr kontaktreizbarer Bereich an den Blattstielen oder der Sproßachse einer zweiten Tabak-Pflanze mit Klebeband fixiert.

#### **2.1.4 *Ricinus communis***

*Ricinus communis* wurde aus Samen auf Sand angezogen und im Gewächshaus unter den gleichen Bedingungen wie der Parasit gehalten (siehe 2.1.1).



**Abb. 2.1.** Die verwendeten Wirt-Parasit-Systeme

(A) *Cuscuta reflexa* auf *Pelargonium zonale*; "paralleler" Infektionsmodus am Blattstiel

(AA) Lineare Anordnung der Haustorien am Blattstiel beim "parallelen" Infektionsmodus; Ausschnittsvergrößerung von (A)

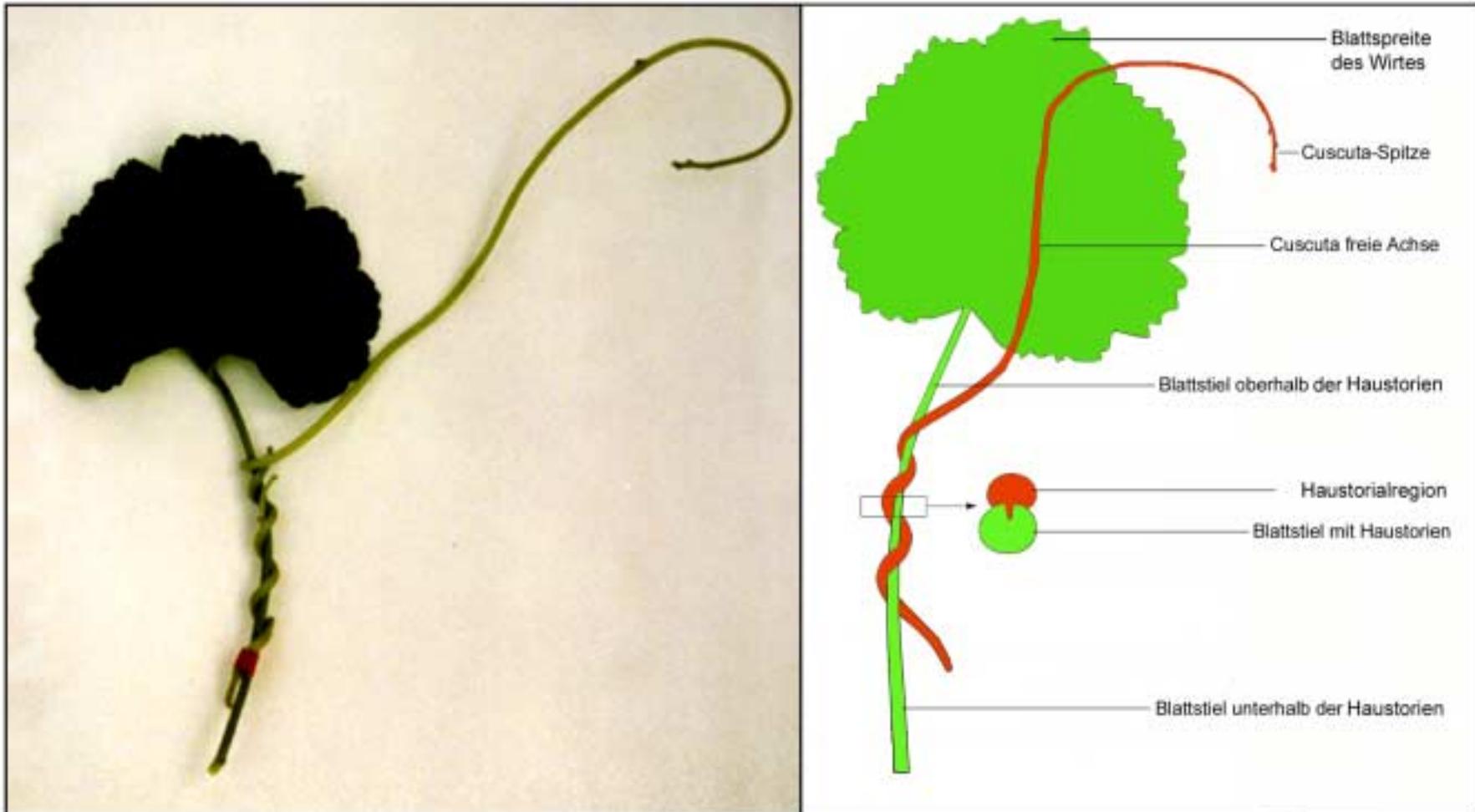
(B) Gewundene Anordnung der Haustorien am Blattstiel von *Pelargonium zonale* beim "gewundenen" Infektionsmodus

(C) "Brücken"-Infektion zweier *Nicotiana benthamiana*-Pflanzen zur Untersuchung der Virustranslokation; WP 1 - zuerst mit *Cuscuta* parasitierte Wirtspflanze, WP 2 - zweite Wirtspflanze auf die der Parasit übergeleitet wurde; an beiden Wirtspflanzen "gewundener" Infektionsmodus

(D) *Cuscuta reflexa* auf *Nicotiana benthamiana*; gewundene Infektion der Sproßachse

Der Pfeil bezeichnet die jeweiligen Parasitierungsorte.

Abb.2.2. Wirt-Parasit-System *Pelargonium zonale*-*Cuscuta reflexa* - Bezeichnung der Abschnitte



## 2.2 Einteilung der Wirt-Parasit-Systeme für die Aufarbeitung

Für die Aufarbeitung wurde der Parasit mit der Rasierklinge sorgfältig von dem parasitierten Wirtsgewebe abgetrennt, wobei die Haustorien im Wirtsgewebe verblieben. Die parasitierten Blattstiele bzw. Sproßachsen und die *Cuscuta*-Achse wurden anschließend in definierte Abschnitte zerschnitten. Abbildung 2.2 zeigt die einzelnen Abschnitte für das Wirt-Parasit-System *Pelargonium zonale-Cuscuta reflexa*.

Folgende Abschnitte wurden getrennt aufgearbeitet:

- Blattspreite des Wirtes
- Blattstiel oberhalb der Haustorien
- Blattstiel mit Haustorien = parasitierter Blattstiel mit den nach Abtrennung der haustorienbildenden *Cuscuta*-Achse verbleibenden apikalen Abschnitte der Haustorien
- Blattstiel unterhalb der Haustorien
- *Cuscuta* – Haustorialregion = Haustorienbildende *Cuscuta*-Achse ohne apikale Abschnitte der Haustorien
- freie *Cuscuta*-Achse = Bereich zwischen haustorienbildendem Abschnitt und Spitze
- *Cuscuta*-Spitzenregion = wachsende Spitze und anschließender kontaktreizbarer Bereich bis 7,5cm

## 2.3 Applikation der radioaktiv markierten Verbindungen

### 2.3.1 Applikation von $^{14}\text{CO}_2$

Zur Untersuchung der Translokation radioaktiv markierter Assimilate wurden die Spreiten isolierter, am Blattstiel parasitierter *Pelargonium*-Blätter mit  $^{14}\text{CO}_2$  begast.

25 Stunden vor Versuchsbeginn wurden die parasitierten *Pelargonium*-Blätter von der Pflanze abgetrennt und mit dem Blattstiel für 30 Minuten in 10mM EDTA in 10mM MES-NaOH (pH 5,0) gestellt. Dadurch sollte eine Unterbrechung des Phloemstromes durch Verschließen der verwundeten Siebröhren verhindert werden. Anschließend wurden die Blätter in 10mM MES-NaOH (pH 5,0) überführt. In dieser Lösung verblieben sie während des gesamten Versuches.

24 Stunden vor Versuchsbeginn wurden die Spreiten in Assimilationskammern (Volumen  $\approx 20\text{cm}^3$ ) eingespannt, die in einem Pflanzenwuchsschrank mit definierten Bedingungen (Lichtphase 16 Stunden, Lichtintensität  $125\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , Luftfeuchte Tag 60%/Nacht 80%, Temperatur Tag  $22^\circ\text{C}$ / Nacht  $15^\circ\text{C}$ ) installiert waren. Mittels Pumpen wurden die Kammern mit Außenluft versorgt.

$^{14}\text{CO}_2$  ( $\approx 1,83 * 10^6\text{dpm}$  / Versuchsansatz) wurde in kleinen gasdicht verschließbaren Glasröhrchen ( $\approx 0,5\text{cm}^3$ ) durch Zusammengeben von  $10\mu\text{l}$  5% Perchlorsäure +  $10\mu\text{l}$   $^{14}\text{C}$ -Natriumcarbonat im Wasserbad bei  $60^\circ\text{C}$  und unter Anlegen eines leichten Vakuums freigesetzt und in die Assimilationskammern eingeleitet. Die Markierung mit  $^{14}\text{CO}_2$  dauerte 5 Minuten, anschließend wurde überschüssiges  $^{14}\text{CO}_2$  durch mit 4N KOH getränkte Watte geleitet und die Assimilationskammern wieder an die Außenluft angeschlossen. Nach definierten Translokationszeiten wurden die Blätter aus den Kammern ausgespannt und die Wirt-Parasit-Systeme entsprechend der zu untersuchenden Fragestellung aufgearbeitet.

### **2.3.2 Applikation radioaktiver Lösungen durch Auftropfen auf die Blattspreiten**

Erfolgreich am Blattstiel parasitierte Blätter von *Pelargonium zonale* wurden 24 Stunden vor Versuchsbeginn von der Pflanze abgetrennt, wie in 2.3.1 beschrieben, vorbehandelt und anschließend in eine Glaskammer mit wassergesättigter Atmosphäre bei Raumtemperatur ohne Zusatzbeleuchtung überführt. Die Applikation der radioaktiv markierten Lösungen erfolgte am Blattgrund zwischen den Blattadern auf einer Fläche von  $\approx 3\text{cm}^2$ , die vorher mit extra feinem Sandpapier leicht aufgeraut wurde. Pro Blatt wurden  $5\mu\text{l}$  der zu untersuchenden Substanz definierter Konzentration in 10mM MES/NaOH (pH 5,0) aufgetragen. Um eine bessere Aufnahme zu erzielen, wurde die Applikationsstelle im Abstand von 30 Minuten zweimal mit Puffer nachgefeuchtet. Nach Ablauf der Translokationszeit wurden die Wirt-Parasit-Systeme in definierte Abschnitte (siehe 2.2) zerteilt, deren Frischmasse bestimmt und wie unter 2.3.5 beschrieben, aufgearbeitet.

### **2.3.3 Applikation radioaktiver Substanzen durch Injektion**

Die Versuchssysteme wurden wie unter 2.3.1 und 2.3.2 beschrieben vorbehandelt. Die Injektion erfolgte mit einer  $5\mu\text{l}$ -Spritze mit angeschliffener Nadel entweder in das Parenchym zwischen den Blattadern am Blattgrund in Richtung Blattstiel oder unterhalb der Blattspreite direkt in das Parenchym des Blattstiels. Alle Substanzen wurden in 10mM MES/NaOH (pH 5,0) appliziert. Nach dreistündiger Translokationszeit wurde das Wirt-Parasit-System in definierte Abschnitte zerschnitten, deren Frischmasse bestimmt und wie unter 2.3.5 beschrieben, aufgearbeitet.

### **2.3.4 Applikation radioaktiv markierter Lösungen an ausgestanzte Blattscheiben von *Ricinus communis***

Aus den Keimblättern 9 Tage alter *Ricinus*-Pflanzen wurden mit Hilfe eines Korkbohrers Blattscheiben mit einem Durchmesser von 7mm ausgestanzt. Die Applikation der radioaktiv markierten Substanzen definierter Konzentration erfolgte durch dreistündige Inkubation der Blattscheiben in gepuffertem Medium (10mM MES/NaOH, pH 5,0) bei Raumtemperatur und unter Schütteln. Anschließend wurden die Blattscheiben in 10mM MES/NaOH (pH 5,0) gewaschen, die Frischmasse bestimmt und wie unter 2.3.5 beschrieben, aufgearbeitet.

### **2.3.5 Extraktion des Pflanzenmaterials**

Nach Bestimmung der Frischmasse wurden die einzelnen Abschnitte der jeweiligen Wirt-Parasit-Systeme mit Hilfe einer Rasierklinge manuell grob zerkleinert. Als Extraktionsmittel diente in der Regel Methanol (10ml /g FM). Für die Extraktion glyphosathaltiger Gewebe und für die Extraktion der löslichen Assimilatfraktion zur anschließenden Auftrennung mittels Ionenaustauscher wurde 70%iges Methanol eingesetzt. Alle Proben wurden über Nacht (mindestens jedoch für 12 Stunden) unter Schütteln extrahiert.

### **2.3.6 Radioaktivitätsmessung**

Die Quantifizierung der Radioaktivität erfolgte durch Flüssigszintillationsmessung (LS 6000, Beckman Instruments Inc., Fullerton, USA). Organische Proben wurden mit einem Toluol-Cocktail (4g 2,5-Diphenyloxazol, 0,24g 2,2-p-Phenyl-bis-5-Phenyloxazol auf 1l Toluol, 7,5ml Szintillatormischung / 5ml Probe), wässrige mit Ready Solv™HP (Beckman Instruments Inc., Fullerton, USA; 4ml Szintillator / 1ml Probe) versetzt. Für die Messung doppelmarkierter Proben wurde im Versuchsansatz auf ein Isotopenverhältnis von  $^3\text{H} : ^{14}\text{C} = 4 : 1$  geachtet.

Um auch im Pflanzenmaterial durch Stoffwechselprozesse fest eingebaute und mit Methanol nicht extrahierbare radioaktive Verbindungen bei der Radioaktivitätsmessung mit zu erfassen, wurde das zerkleinerte Pflanzenmaterial mit Ausnahme der Blattspreiten des Wirtes bei der Radioaktivitätsbestimmung in der Meßprobe belassen.

## 2.4 Translokation von Fluoreszenzfarbstoffen

### 2.4.1 Herstellen der Farbstofflösungen

Für die mikroskopischen Untersuchungen wurden Esterformen der phloemmobilen Fluoreszenzfarbstoffe Carboxyfluoreszein (CF) [Esterform – CFDA (5,6 Carboxyfluoresceindiacetat), gemischte Isomere, Molekular Probes Eugene, Oregon USA, C-195] und Hydroxypyrentrisulfonsäure (HPTS) [Esterform – HPTSA (8-Acetoxypyrene-1,3,6-Trisulfonsäure Natriumsalz), Molekular Probes Europe, BV A-396] und der Xylemmarker Texas Red Dextran 3000 (Molekular Probes Eugene, Oregon USA, D-3328 ) verwendet.

Von allen Farbstofflösungen wurden Stammlösungen hergestellt, die bei -20°C bis zu 7 Tage gelagert werden konnten. Sie wurden für die Applikation entsprechend verdünnt:

Farbstoff	Stammlösung	Verdünnung mit H <sub>2</sub> O zur Applikation
CFDA	6mg / ml Aceton	1 : 20
HPTSA	5mg /ml H <sub>2</sub> O	unverdünnt
Texas Red Dextran 3000	6mg / ml Methanol	1 : 20

### 2.4.2 Applikation der Farbstoffe

Die Translokation der Fluoreszenzfarbstoffe wurde im Wirt-Parasit-System *Nicotiana benthamiana-Cuscuta reflexa* untersucht. Die Wirtspflanzen waren zum Zeitpunkt des Versuches 7-8 Wochen alt, die Parasitierung erfolgte am Blattstiel oder an der Sproßachse im parallelen Induktionsmodus.

#### Applikation von CFDA und HPTSA

Zur Applikation der Farbstoffe wurde die obere Epidermis ausgewachsener Blätter ( $\approx 80\text{cm}^2$ ) ganzflächig mit extra feinem Sandpapier aufgeraut. Danach wurden pro Blattspreite 0,5ml Farbstofflösung tropfenförmig aufgetragen. Um den Turgor der Blätter zu erhalten, ein Eintrocknen der Farbstofflösung sowie ein Herabtropfen auf andere Blätter zu vermeiden, wurden die Blattspreiten mit Haushaltsfolie abgedeckt. Die Wirt-Parasit-Systeme wurden beleuchtet ( $120\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) und gut bewässert. Die mikroskopischen Analyse erfolgte nach 1,5 Stunden.

Texas Red Dextran 3000

Für eine Doppelmarkierung von Phloem und Xylem wurden die parasitierten Sproßachsen eine Stunde nach Applikation der phloemmobilen Farbstoffe 10cm unterhalb des parasitierten Blattes von der Pflanze abgetrennt und für 30 Minuten mit der Schnittfläche in die Texas Red Dextran 3000 Lösung eingestellt.

### **2.4.3 Translokation von GFP**

*Nicotiana tabacum*-Pflanzen der F1-Generation der AtSUC2-Promotor-GFP-Pflanzen\*<sup>1</sup> (IMLAU et al., 1999) wurden im Alter von 7-8 Wochen an der Sproßachse und an den Blattstielen mit *Cuscuta reflexa* im „gewundenen„ Induktionsmodus parasitiert. Nach 16 Tagen wurden Querschnitte durch die parasitierten Bereiche der Blattstiele bzw. Sproßachsen einschließlich der umwindenden *Cuscuta* angefertigt und unter dem Konfokalen Laser Scanning Mikroskop ausgewertet.

### **2.4.4 Anfertigen der Handschnitte**

Für alle Untersuchungen am Konfokalen Laser Scanning Mikroskop wurden Handschnitte mit der Rasierklinge angefertigt und anschließend auf dem Objektträger in Silikonöl eingebettet. Bei den Experimenten zur Translokation von Fluoreszenzfarbstoffen betrug die Zeit zwischen Schneiden und Auswertung maximal 20 Minuten, um eine Wiederaufnahme des aus den verwundeten Zellen ausgetretenen Farbstoffes ins Gewebe zu vermeiden.

### **2.4.5 Konfokales Laser Scanning Mikroskop**

Zur Lokalisation der fluoreszierenden Farbstoffe und Viren wurde ein Konfokales Laser Scanning Mikroskop MRC 1000 (BIO-RAD, Hemel Hempstead) mit einem Krypton / Argon Laser benutzt.

Für die Betrachtung der GFP-exprimierenden Viren und der phloemmobilen Fluoreszenzfarbstoffe CF und HPTS wurde ein Blaufilter (488nm) verwendet, für die Detektion von Texas Red Dextran 3000 wurde mit einem Grünfilter (568nm) gearbeitet.

---

<sup>1</sup> Die Samen der Pflanzen wurden uns von Prof. Dr. Norbert Sauer (Universität Erlangen) freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

## 2.5 Anfertigung der Semidünnschnitte

Erfolgreich parasitierte Blattstiele von *Pelargonium* wurden in 1-2mm dicke Scheiben geschnitten und mit Hilfe eines Einbettungsautomaten (LYNX™el, Australian Biomedical Corporatio, LTD, Mount Waverley, Vic. Australien) mit Glutaraldehyd fixiert, mit Osmiumtetroxid kontrastiert und in ERL (Fluka, Buchs, Schweiz) eingebettet.

Die Polymerisation erfolgte während 120 Stunden bei 60°C. Zur Anfertigung der Semidünnschnitte (Dicke = 0,5µm) wurde ein Ultramikrotom (Reichert OmU 2, Wien, Österreich) benutzt. Für die Photographie wurden die Schnitte mit Azur2-Methylenblau (1% Azur 2 in Aqua dest./ 1% Methylenblau in 1% Borax; = 1:1) gefärbt.

## 2.6 Dünnschichtchromatographie (DC)

Für die Trennung von Zuckern wurden Kieselgel Fertigplatten (Silufol, Kavalier Votice, Tschechien) verwendet. Methanolische Extrakte der zu untersuchenden Pflanzenabschnitte wurden am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt, in einer definierten Menge Methanol aufgenommen und 10-20µl dieser Lösung punktförmig aufgetragen. Die Trennung erfolgte durch fünfmaliges Entwickeln in Chloroform : Eisessig : Wasser = 30 : 35 : 5 bei voller Kammersättigung (DE STEFANIES & PONTE, 1968). Die Detektion der einzelnen Zucker erfolgte durch Besprühen mit Anilin-Diphenylamin und anschließender Erwärmung der Folien auf 110°C im Trockenschrank (SCHWIMMER & BEVENNE, 1956). Die Zucker erscheinen dabei in folgenden Farben: Saccharose – graubraun, Glucose – blau, Fructose – rot. Zur Identifizierung diente ein Standardgemisch aus Saccharose, Glucose und Fructose. Für die quantitative Radioaktivitätsbestimmung der markierten Zucker wurden die entwickelten Chromatogramme auf einem Screen exponiert und mit dem Phosphorimager ausgewertet.

## 2.7 Nachweis der Lokalisation radioaktiv markierter Verbindungen mit dem Phosphorimager

Zum Nachweis der Lokalisation radioaktiver Verbindungen in Geweben wurden 1mm dicke Handschnitte aus den zu untersuchenden Pflanzenabschnitten angefertigt, bei -20°C eingefroren und für 24 Stunden zwischen Objekträgern gefriergetrocknet.

Dünnschichtchromatogramme wurden nach dem Entwickeln sorgfältig getrocknet, um alle Laufmittelreste zu entfernen, die zu einer Beschädigung des Screens führen können.

Je nach Radioaktivitätsgehalt erfolgte die Exposition der gefriergetrockneten Handschnitte bzw. die Dünnschichtchromatogramme für 12-96 Stunden auf einem Storage Phosphor

Screen (Molecular Dynamics). Anschließend wurden die Screens mit dem Phosphor Imager<sup>TM</sup> (Molecular Dynamics) eingescannt. Für die Auswertung und Bildbearbeitung wurden die Programme „Image Quant<sup>TM</sup>“ und „Adobe Photoshop<sup>TM</sup> 5.0“, verwendet.

## 2.8 Bestimmung von Enzymaktivitäten

### 2.8.1 Invertase

„In-vivo“, Bestimmung der zellwandgebundenen sauren Invertase (modifiziert nach WOLSWINKEL, 1977)

Das in ca. 1mm dicke Scheiben zerschnittene pflanzliche Material wurde 30 Minuten in 5mM MES/NaOH (pH 5,0) mit 1mM CaSO<sub>4</sub> (10ml / g FM) geschüttelt, um den apoplastischen Raum von Zuckern frei zu waschen. Im Anschluß daran erfolgte eine dreistündige Inkubation in 10 mM Saccharose in 5mM MES/NaOH (pH 4,7). Zur quantitativen Bestimmung der freigesetzten Glucose wurde der Fermognost<sup>®</sup> Glucose-Test (Feinchemie GmbH Sebnitz) benutzt. Bei der Bestimmung wird die in der Lösung befindliche Glucose durch Glucoseoxidase in Gegenwart von Sauerstoff und Wasser zu Gluconsäure und Wasserstoffperoxid umgesetzt, das anschließend im Ansatz enthaltenes o-Dianisidin unter Mitwirkung von Peroxidase zu einem in saurer Lösung stabilen roten Farbstoff mit einem Absorptionsmaximum bei 530nm dehydriert. Die Angabe der Enzymaktivität erfolgte in µmol freigesetzter Glucose /mg FM\*min.

„In-vitro Bestimmung“, der zellwandgebundenen und der löslichen sauren und alkalischen Invertase (nach WEBER et al., 1995 b; 1996 b)

Für die Enzympräparation wurden Mischproben aus 4 Wirt-Parasit-Systemen *Pelargonium-Cuscuta* verwendet. Die zu untersuchenden Pflanzenabschnitte wurden im fünffachen Volumen Extraktionslösung (20mM Na-Acetat, pH 5,2) aufgenommen, gründlich gemörsert, die Homogenate auf dem Vortex gut durchmischt und anschließend 10 Minuten bei 4°C und 13.000 UPM zentrifugiert. Nach der Zentrifugation befanden sich im Überstand die löslichen Invertasen, im Pellet die saure zellwandgebundene Invertase. Das Pellet wurde dreimal in Extraktionslösung und viermal in Aqua dest. gewaschen, die jeweiligen Überstände wurden verworfen. Bei allen Vorgängen wurde auf Eis gearbeitet.

Zur Aktivitätsbestimmung der einzelnen Invertasen wurden definierte Mengen des Pellets bzw. des Überstandes mit Bestimmungspuffer pH 4,5 (zellwandgebundene und lösliche

saure Invertase) bzw. pH 7,0 (alkalische Invertase) inkubiert.

Zusammensetzung des Bestimmungspuffers:

- 50mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O pH 4,5 bzw.7,0
- 50mM Zitronensäure
- 100mM Saccharose

Inkubationsansätze:

- Saure zellwandgebundene Invertase  
10mg Zellwandpellet + 140µl Extraktionslösung + 150µl Bestimmungspuffer (pH 4,5)
- Saure lösliche Invertase  
150µl Überstand + 150µl Bestimmungspuffer (pH 4,5)
- Neutrale lösliche Invertase  
150µl Überstand + 150µl Bestimmungspuffer (pH 7,0)

Inkubation: 20 Minuten unter Schütteln bei 30°C.

Abstoppen: 10 Minuten Erhitzen auf 95°C im Wasserbad.

Die Kontrolle wurden sofort bei 95°C für 15 Minuten inkubiert. Nach dem Abkühlen wurden die Proben für 10 Minuten bei 10.000 UPM zentrifugiert. Der Überstand wurde für die Glucosebestimmung mit dem Bestimmungskit 716251 von Boehringer-Mannheim eingesetzt.

Die Enzymaktivität wurde für die zellwandgebundene Invertase in µmol Glucose /mg ZW\*min, für die löslichen Invertasen mit µmol Glucose /mg FM\*min angegeben.

### **2.8.2 Saccharosesynthase (Susy)**

Die Bestimmung der Saccharosesynthase-Aktivität erfolgte in Richtung Saccharosespaltung nach WEBER et al. (1996 a). Definierte Abschnitte des Wirt-Parasit-Systems wurden nach Bestimmung der Frischmasse im dreifachen Volumen Extraktionspuffer gemörsert (100mM MOPS/KOH (pH 7,5); 10mM MgCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O; 1mM EDTA; 1mM EGTA; 2mM DTT). Nach gründlichem Mischen auf dem Vortex wurden die Proben für 10 Minuten bei 4°C und 10.000 UPM zentrifugiert.

Zur Aktivitätsbestimmung des Enzyms wurden 30µl des Überstandes mit 150µl Bestimmungspuffer I vermischt und für 10 Minuten bei 25°C unter Schütteln inkubiert.

Zusammensetzung des Bestimmungspuffers I:

- 75mM HEPES/KOH (pH 7,5)

- 7mM MgCl<sub>2</sub> x H<sub>2</sub>O
- 4mM UDP
- 200mM Saccharose

Zusammensetzung des Bestimmungspuffers II:

- 200mM Glycin (pH 8,8)
- 5mM MgCl<sub>2</sub> x H<sub>2</sub>O
- 1mM NAD

Zum Abstoppen der Reaktion wurden die Proben für 5 Minuten bei 95°C inkubiert. Nach Abkühlen der Proben auf Raumtemperatur wurden 750µl Bestimmungspuffer II und 3µl UDP-Glucose-Dehydrogenase zugegeben. Anschließend erfolgte eine halbstündige Inkubation bei 37°C, unter Schütteln. Die Proben wurden 10 Minuten bei 13.000 UPM zentrifugiert und der Überstand bei 340nm vermessen.

### **2.8.3 ADP-Glucose-Pyrophosphorylase (AGPase)**

Die Bestimmung der AGPase erfolgte nach WEBER et al. (1995 a). Definierte Abschnitte des Wirt-Parasit-Systems wurden nach Bestimmung der Frischmasse im dreifachen Volumen an Extraktionspuffer gemörstert (100mM MOPS/KOH (pH 7,5); 10mM MgCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O; 1mM EDTA; 1mM EGTA; 2mM DTT). Nach gründlichem Mischen auf dem Vortex wurden die Proben für 10 Minuten bei 4°C und 10.000 UPM zentrifugiert.

Zur Aktivitätsbestimmung des Enzyms wurden 30µl des Überstandes mit 650µl Bestimmungspuffer und 10µl 2mM Natriumpyrophosphat vermischt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert.

Zusammensetzung des Bestimmungspuffers I:

- 100mM HEPES/KOH (pH 7,8)
- 5mM MgCl<sub>2</sub> 6 x H<sub>2</sub>O
- 2mM ADP-Glucose
- 0,5mM NAD
- 2U Phosphoglucomutase
- 5U NAD-Glucose-6-Phosphatdehydrogenase

Das entstehende NADH wurde im UV-Spektrometer bei 340nm gemessen.

## 2.9 Fraktionierung pflanzlicher Extrakte mittels Ionenaustauscher

Parasitierte Blätter von *Pelargonium zonale* wurden nach dem Begasen mit  $^{14}\text{CO}_2$  und unterschiedlichen Translokationszeiten (3, 24 und 72 Stunden) in definierte Abschnitte zerteilt und über Nacht, mindestens jedoch 12 Stunden in 70%igem Methanol unter Schütteln extrahiert. Die Proben wurden anschließend 10 Minuten bei 5000 UPM zentrifugiert. Die Pellets wurden zum Stärkeaufschluß, die Überstände für die Fraktionierung mittels Ionenaustauscher und für die Zuckerchromatographie verwendet (siehe 2.6).

Die Überstände wurden im Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt und die Rückstände in einer definierten Menge Aqua dest. resuspendiert. Die Fraktionierung der Proben in organische Säuren, Aminosäuren und neutrale Verbindungen erfolgte bei Raumtemperatur.

Als Kationenaustauscher wurde AG<sup>®</sup> 50W-X4 von BIO-RAD benutzt. Die Aminosäuren wurden mit 10%iger Ammoniaklösung in 50% Ethanol eluiert. Als Anionenaustauscher wurde Bio Rex 5 (BIO-RAD) in 10mM Tris/HCl (pH 8,0) verwendet. Die organischen Säuren wurden mit 2N Ameisensäure eluiert.

Das Effluat und die Eluate wurden mittels Vakuumkonzentrator zur Trockne eingengt, in einen geringen Volumen Aqua dest. aufgenommen und aliquote Mengen davon nach Neutralisation für die Radioaktivitätsbestimmung eingesetzt.

## 2.10 Stärkeaufschluß

Die Pellets wurden sechsmal mit Aqua dest. gewaschen, anschließend im zehnfachen Volumen Aqua dest. aufgenommen und zur Gelatinisierung eine Stunde im Wasserbad auf 100°C erhitzt. Nach dem Abkühlen der Proben wurde ein adäquates Volumen an Aufschlußpuffer (50mM Natriumacetat / Essigsäure (pH 4,5) mit 20U/ml Amyloglucosidase) hinzugefügt und über Nacht unter Schütteln inkubiert. Nach Filtration und Einengen der Proben im Vakuumkonzentrator bis zur Trockne wurden die Proben in einer definierten Menge Aqua dest. aufgenommen, neutralisiert und aliquote Teile für die Bestimmung der Radioaktivität eingesetzt.

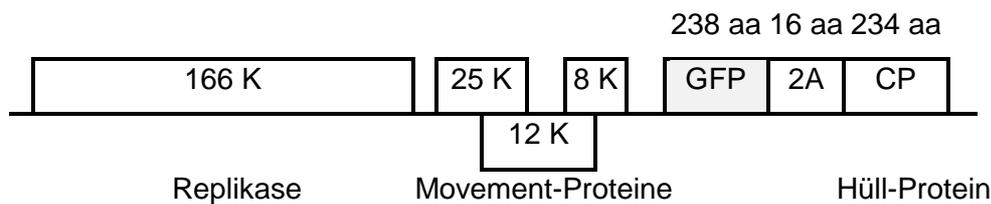
## 2.11 Translokation von Viren

Alle Arbeiten zur Translokation von Viren wurden am Scottish Crop Research Institute in Dundee, Schottland in der Arbeitsgruppe von Prof. Karl Oparka durchgeführt. Die für die Arbeiten notwendigen Virenplasmide und die beim Western Blotting und der RT-PCR

eingesetzten Marker wurden vom Department of Virology des Institutes zur Verfügung gestellt.

### 2.11.1 Kartoffel Virus X

Für die Translokation von Viren wurde ein gentechnisch modifizierter Potexvirus Kartoffel Virus X verwendet, dem das green fluorescing protein (GFP) der Meeresqualle *Aequorea victoria* in das Genom eingeschleust wurde. Es war an das Hüllprotein gebunden. Ein Schema des Genoms von PVX.GFP ist in Abbildung 2.3 dargestellt.



**Abb.2.3:** Schematische Repräsentation der viralen cDNA von *PVX.GFP-CP*. Die Boxen stellen codierende Sequenzen dar. (K = kDa).

### 2.11.2 Inokulieren der Wirtspflanze

#### Herstellen von Virus-RNA-Kopien

Unter Verwendung des mMESSAGE mMACHINE™ T7 RNA Polymerase Kits und unter Einhaltung der Arbeitsanleitung wurden Kopien der Virus-RNA vom Plasmid hergestellt. Die eingesetzte Konzentration des Templates betrug 0,2µg / µl. Der Kit wurde 1,5 Stunden bei 37°C inkubiert und anschließend unverdünnt für die Inokulierung der Blattspreiten eingesetzt.

#### Ernten von Virus-Partikeln aus infizierten Pflanzen

Neben der Nutzung der RNA-Kopien wurde auch der Saft virusinfizierter Blätter für eine Neuinfektion verwendet. Hierzu wurden infizierte sink-Blätter von *Nicotiana benthamiana* im Gewächshaus geerntet und vor Ort in 0,5M Natriumborat-Puffer (pH 8,2), (2ml Puffer / g FM) gemörsert. Die Suspension konnte in Eppendorftubes bei - 20°C gelagert werden.

## **Inokulieren**

Um die source-Blätter der Tabak-Pflanze mit dem entsprechenden Virus zu infizieren, wurden diese um eventuelle Rückstände von Schädlingsbekämpfungsmitteln zu entfernen mit Leitungswasser gereinigt und anschließend sorgfältig getrocknet. Die Blattspreiten wurden dünn mit Aluminiumoxidstaub (Carborandumpuder extra fein) bestäubt. Anschließend wurden 4µl Transcript oder 20µl einer Viruspartikel enthaltenen Suspension je Blattspreite aufgetragen und mit dem Finger auf der gesamten Fläche verrieben. Die Blattspreiten wurden danach mit fließendem Wasser von Carborandumpuder und Zelltrümmern gereinigt. Die so behandelten Pflanzen wurden bis zum folgendem Morgen vollständig mit Zeitungspapier abgedeckt.

Für die Inokulierung der „Brücken,-Infektionen wurden 7 Tage nach Parasitierung der ersten Wirtspflanze die unteren source-Blätter mit dem Virus-Transkript bzw. der die Viruspartikel enthaltenen Suspension inokuliert. Innerhalb einer Woche hatte sich die Virus-Infektion in der ersten Tabak-Pflanze systemisch ausgebreitet.

14 Tage nach der Infektion der zweiten Pflanze konnte das Wirt-Parasit-System für mikroskopische und molekularbiologische Untersuchungen genutzt werden.

## **2.12 RNA-DNA-Methoden**

### **2.12.1 RNA-Isolation aus dem Wirt-Parasit-System *N. benthamiana*-*C. reflexa***

Nach erfolgreicher „Brücken,-Infektion des Wirt-Parasit-Systems *Nicotiana benthamiana*-*Cuscuta reflexa* wurden sink-Blätter beider Wirtspflanzen geerntet. Nach Bestimmung der Frischmasse wurden die Proben im zweifachen Volumen an Homogenisierungspuffer [50mM Tris-HCl (pH 9,0), 100mM NaCl, 2% (w/v) SDS, 10mM EDTA ] sorgfältig gemörsert. Danach wurden die Proben mit einem aliquoten Volumen wassergesättigtem Phenol / Chloroform [1 : 1 (v/v)] vermischt und zentrifugiert (4°C, 14.000 UPM, 10min). Der abgenommene Überstand wurde erneut mit Phenol / Chloroform behandelt. Die Phenol / Chloroform-Extraktion wurde so oft wiederholt, bis die phenolische Phase klar und frei von Pigmenten war. Zur Fällung der RNA wurden 10% (v/v) 3M Natriumacetat und 2,5vol% Isopropanol zugegeben und für 20 Minuten bei -20°C inkubiert. Nach Zentrifugation (4°C, 14.000 UPM, 20min) wurde das Pellet zweimal mit 0,25ml 70%igem Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen wurde das Pellet in 50µl sterilem Aqua dest. resuspendiert. Zur Bestimmung der RNA-Konzentration wurde die Extinktion bei 260nm gemessen. Um den Kontaminationsgrad durch Proteine zu prüfen, wurde eine zusätzliche Extinktionsbestimmung bei 280nm vorgenommen.

### 2.12.2 Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Der Einsatz der Reversen Transkriptase ermöglicht die Synthese eines zur Template-RNA komplementären DNA-Stranges (cDNA). Für die Reaktion wurden 1µl RNA-Lösung und 1µl 20µM Primer OX-5 (siehe Tabelle 2.1) mit Aqua dest. auf genau 11µl aufgefüllt, gemischt (Vortex), für 10 Minuten bei 70°C inkubiert und anschließend in Eiswasser überführt. Weiterhin wurden jeder Probe 4µl 5x Superscript<sup>TM</sup>-Puffer, 2µl 100mM DTT, 1µl 10mM dNTPs, 1µl RNase Guard (Promega, RNasin® Ribonuclease Inhibitor) und 1µl Superscript Reverse Transkriptase zugegeben. Der Reaktionsansatz wurde gemischt und für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit Aqua dest. auf ein Endvolumen von 50µl aufgefüllt und ein adäquates Volumen Phenol / Chloroform zugegeben. Nach der Zentrifugation (4°C, 14.000 UPM, 10 Minuten) erfolgten die Abnahme und Reinigung des Überstandes über Sephadex-Säulchen (Sephadex CL-6B, Pharmacia) und das Ansetzen der PCR (2.12.3).

**Tab.2.1: Übersicht über den für die Reverse Transkriptase-Reaktion verwendeten Primer**

Primer	Position am 5'Ende	Primersequenz (5'- 3')
OX-5	6408	GAAAATACTATCAAAGTGGG

### 2.12.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Um das synthetisierte cDNA-Fragment zu vervielfältigen, wurde im Anschluß an die cDNA-Synthese eine PCR durchgeführt. Der Standardreaktionsansatz enthielt: 2,5µl Probe (cDNA); 2,5µl 10 x PCR-Puffer; 0,75µl 50mM MgCl<sub>2</sub>; 0,5µl 10mM dNTPs; 0,5µl 20µM Primer OX-9; 0,5µl 20µM Primer OX-10 (siehe Tabelle 2.2); 0,2µl Taq-Polymerase (0,02U / µl, AmpliTaq® DNA Polymerase, Perkin Elmer), die mit sterilem Aqua dest. auf ein Endvolumen von 25µl gebracht wurden.

Standardprotokoll für die PCR:

1.	94°C	2'	Denaturierung
2.	92°C	30''	Denaturierung*
3.	50°C	30''	Annealing*
4.	72°C	30''	Elongation*

- |    |      |    |               |
|----|------|----|---------------|
| 5. | 72°C | 5' | Nachsynthese  |
| 6. | 4°C  | -- | Reaktionsende |
- \* Schritt 2-4 mit 25-30 Zyklen

**Tab.2.2: Übersicht über die bei der PCR verwendeten Primer**

Primer	Position am 5'Ende	Primersequenz (5' -3')
OX-9	6239	AAGGCAGCAGTTTGGGC
OX-10	5547	ATCACAGTGTTGGCTTGC

#### 2.12.4 Agarose-Gelelektrophorese

Um den Erfolg der PCR zu überprüfen, wurden horizontale Flachbett-Gelelektrophoresen mit 1%igen Agarosegelen durchgeführt. Als Elektrophorese-Puffer wurde TBE-Puffer [89mM Borsäure, 89mM Tris, 2mM EDTA (pH 8,0)] verwendet. Die Agarose wurde unter Erhitzen in Elektrophorese-Puffer gelöst. Während des Abkühlens wurde der Lösung (5µl / 100ml) Ethidiumbromid (Stammlösung: 10mg / ml) zugesetzt.

Für die Auftragung wurden den PCR-Proben 1µl-Aliquots entnommen und mit 1µl 10 x DNA-Ladepuffer [50% (w/v) Glycerol, 1mM EDTA, 0,4% (w/v) Bromphenolblau, 0,4% (w/v) Xylencyanol) und 8µl sterilem Aqua dest. versetzt. Neben den Proben wurden ein molekularer Marker (1kb DNA-Leiter, Gibco-BRL), ein PVX.GFP-Standard (cDNA) und ein GFP-Standard (cDNA) aufgetragen. Als Negativkontrolle diente die Probe einer virusfreien Wirtspflanze. Die Elektrophorese lief bei 75 - 100V. Die DNA-Banden wurden unter UV-Licht fotografiert.

#### 2.13 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen

##### 2.13.1 Proteinaufarbeitung aus dem Wirt-Parasit-System *N. benthamiana* – *C. reflexa*

Sink-Blätter der mit *Cuscuta* parasitierten und virusinfizierten (sichtbare virale Symptome und/oder grüne Fluoreszenz unter UV-Licht) Wirtspflanze *Nicotiana benthamiana* wurden geerntet und nach Bestimmung der Frischmasse im zweifachen Volumen Extraktionspuffer [100mM Tris/HCl (pH 7,5), 10mM KCL, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 0,4 M Saccharose, 10% Glycerol, 10mM β-Mercaptoethanol ] gemörsert. Anschließend wurden die Proben unter Zugabe aliquoten Volumens an Protein-Ladepuffer (100mM Tris/HCl (pH 6,8); 200mM Dithiothreitol;

4% SDS; 0,2% Bromphenolblau; 20% Glycerol) für 10 Minuten bei 70°C inkubiert. Die Proben wurden zentrifugiert (10 Minuten, 14.000 UPM) und zur Auftrennung auf ein SDS-Polyacrylamidgel (2.13.2) gegeben.

### **2.13.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Für die elektrophoretische Auftrennung der aufgearbeiteten Proteine wurden 12,5%ige Acrylamidgele (10 x 10 x 0,1cm) verwendet. Für das Trenngel wurden 4,8ml Aqua dest., 6,2ml 30%iges Acrylamid, 3,8ml 4 x Stacking-Puffer [250mM Tris/HCl (pH 8,8), 0,2% (w/v) SDS] zusammengegeben und 20 Minuten entgast. Danach erfolgte die Zugabe von 150µl APS [10% (w/v)] und 10µl TEMED. Anschließend wurde die Gelfront zur Verhinderung von Oxidationen mit wassergesättigtem Isobutanol überschichtet und zum Beschleunigen der Polymerisation 20 Minuten bei 37°C inkubiert.

Das Sammelgel setzte sich aus 2ml Aqua dest., 0,6ml 30%tigem Acrylamid und 0,888ml 4 x Separate-Puffer [1,5M Tris/HCl (pH 6,8), 0,4% (w/v) SDS] zusammen. Nach einer Entgasung von 20 min folgte die Zugabe von 20µl APS [10% (w/v)] und 10µl TEMED.

Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte über einen Zeitraum von 1,5 Stunden bei einer Spannung von 150mV. Der Running-Puffer setzte sich wie folgt zusammen: 0,25M Tris/HCl (pH 9,8), 1% (w/v) SDS, 1,92M Glycin. Neben den aufgearbeiteten Proteinproben wurden ein molekularer Marker (SDS-Page Molecular Weight Standards, Broad Range: 6,5 - 96,0kDa BIORAD) und eine Standardprobe (PVX-Coatprotein, GFP) aufgetragen.

## **2.14 Western Blot (Immunodetektion)**

### **2.14.1 Proteintransfer**

Vor dem Proteintransfer wurden das SDS-Polyacrylamidgel, die BA-S 85 Nitrozellulose (Schleicher & Schüll) und das Whatman-Papier (Roth) für 10min in kaltem Blotpuffer [192 mM Glycin, 25mM Tris, 20% (v/v) Methanol, 0,1% (w/v) SDS; (pH 8,3)] äquilibriert. Der Proteintransfer aus dem Gel auf die Nitrozellulose erfolgte bei Raumtemperatur in einem „Semi-Dry“-Verfahren über einen Zeitraum von 1 Stunde bei einer Stromstärke von 1mA / cm<sup>2</sup>. Nach Beendigung des Blotvorganges wurde die Nitrozellulose-Membran für 5 Minuten in Ponceau-Agens [0,1% (w/v) Ponceau, 5% (v/v) Essigsäure] gegeben, um den Transfererfolg zu überprüfen.

### 2.14.2 Antikörperreaktion

Das Ponceau-Agens wurde durch Waschen der Nitrozellulose mit Leitungswasser entfernt. Anschließend wurde die Membran über Nacht bei 4°C in BPS-Tween-Puffer [20 mM Tris/HCl (pH 7,5), 178mM NaCl, 0,05% (w/v) Tween 20] mit 5% Milchpulver inkubiert. Für die Behandlung mit dem ersten und zweiten Antikörper (siehe Tabelle 2.3) wurde die Nitrozellulose zusammen mit 5ml Antikörperlösung in Haushaltsfolie eingeschweißt und jeweils 1,5 Stunden bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler inkubiert. Nach jeder Antikörperreaktion wurde die Nitrocellulose-Membran fünfmal für 5 Minuten mit BPS-Tween-Puffer gewaschen. Im Anschluß an den letzten Waschvorgang wurde die Membran zum Anfärben der Proteinbanden für 5 Minuten mit 5-Brom-4-Chlor-Indolylphosphat / Nitroblau-Tetrazolium [Sigma FAST, BCIP / NBT Alkaline Phosphate Substrate (1 Tablette / 10ml)] im Dunkeln exponiert. Die Farbreaktion wurde durch Abspülen der Färbelösung mit Wasser gestoppt. Nach dem Trocknen wurde die Nitrocellulose-Membran zur weiteren Dokumentation in Folie eingeschweißt und aufbewahrt.

**Tab. 2.3: Übersicht über die verwendeten Antikörper**

<b>Antikörper</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Konzentration [µl]</b>
Anti-PVX	Scottish Crop Research Institute	1 / 1.000
Anti-Rabbit	Sigma (Saure Alkaline Phosphatase)	1 / 4.000

## 2.15 Verwendete radioaktive Verbindungen

Tab.2.4: In den Experimenten verwendete radioaktive Verbindungen

Substanz	bezogen von	Spezifische Radioaktivität
<sup>3</sup> H-Inulin	Amersham	38,1 GBq ·mmol <sup>-1</sup>
<sup>3</sup> H-Aminoisobuttersäure	ARC	555 GBq ·mmol <sup>-1</sup>
<sup>3</sup> H-Indolylessigsäure	Amersham	925 GBq ·mmol <sup>-1</sup>
<sup>3</sup> H-Abscisinsäure	Amersham	2,11 TBq ·mmol <sup>-1</sup>
<sup>3</sup> H-Saccharose	Amersham	207 GBq ·mmol <sup>-1</sup>
<sup>14</sup> C-Saccharose	Amersham	9,9 GBq ·mmol <sup>-1</sup>
<sup>14</sup> C-Aminoisobuttersäure	Amersham	2,18 GBq ·mmol <sup>-1</sup>
<sup>14</sup> C-Alanin	Amersham	1,5 GBq ·mmol <sup>-1</sup>
<sup>14</sup> C-Leucin	UVVVR Prag	7,4 GBq ·mmol <sup>-1</sup>
<sup>14</sup> C-MCPA	Amersham	2,1 GBq ·mmol <sup>-1</sup>
<sup>14</sup> C-2,4-D	Rosendorf	413,9 MBq ·mmol <sup>-1</sup>
<sup>14</sup> C-Glyphosat	Amersham	2,0 GBq ·mmol <sup>-1</sup>
<sup>14</sup> C-Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Rosendorf	1,67 GBq ·mmol <sup>-1</sup>

## 2.16 Auswertung der Ergebnisse

Zur Absicherung der Ergebnisse wurden alle Versuche mehrmals wiederholt. Die Anzahl der Einzelwerte ist mit „n„ angegeben. Die in den Tabellen angegebenen Ergebnisse stellen, wenn nicht anders vermerkt, Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte dar. Bei den errechneten Standardfehlern wurden Konfidenzgrenzen mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% zu Grunde gelegt.

## 2.17 Begriffsdefinitionen

Mit „**Translokationsrate**„ wird der prozentuale Anteil der aus dem Fütterungsort austransportierten radioaktiven Verbindungen an der Gesamtmenge der radioaktiven Verbindungen im Wirt-Parasit-System (W-P-S) bzw. in der nicht parasitierten Wirtspflanze bezeichnet.

$$\text{Translokationsrate (\%)} = \frac{\text{Radioaktivität außerhalb des Fütterungsorgans (dpm)} * 100}{\text{Radioaktivitätsgehalt des W-P-S (dpm)}}$$

Mit „**Verteilungsmuster**„ wird der prozentuale Anteil der radioaktiven Verbindungen in den einzelnen Pflanzenabschnitten an der Gesamtmenge der radioaktiven Verbindungen im Wirt-Parasit-System (W-P-S) bzw. in der nicht parasitierten Wirtspflanze bezeichnet. Als Bezugsgröße wurde sowohl die aufgenommene als auch die transportierte Radioaktivität verwendet.

$$\text{Verteilungsmuster (\%)} = \frac{\text{Radioaktivitätsgehalt des Pflanzenabschnittes (dpm)} * 100}{\text{Radioaktivitätsgehalt der Gesamtpflanze (dpm)}} \\ \text{(bezogen auf aufgenommene Radioaktivität)}$$

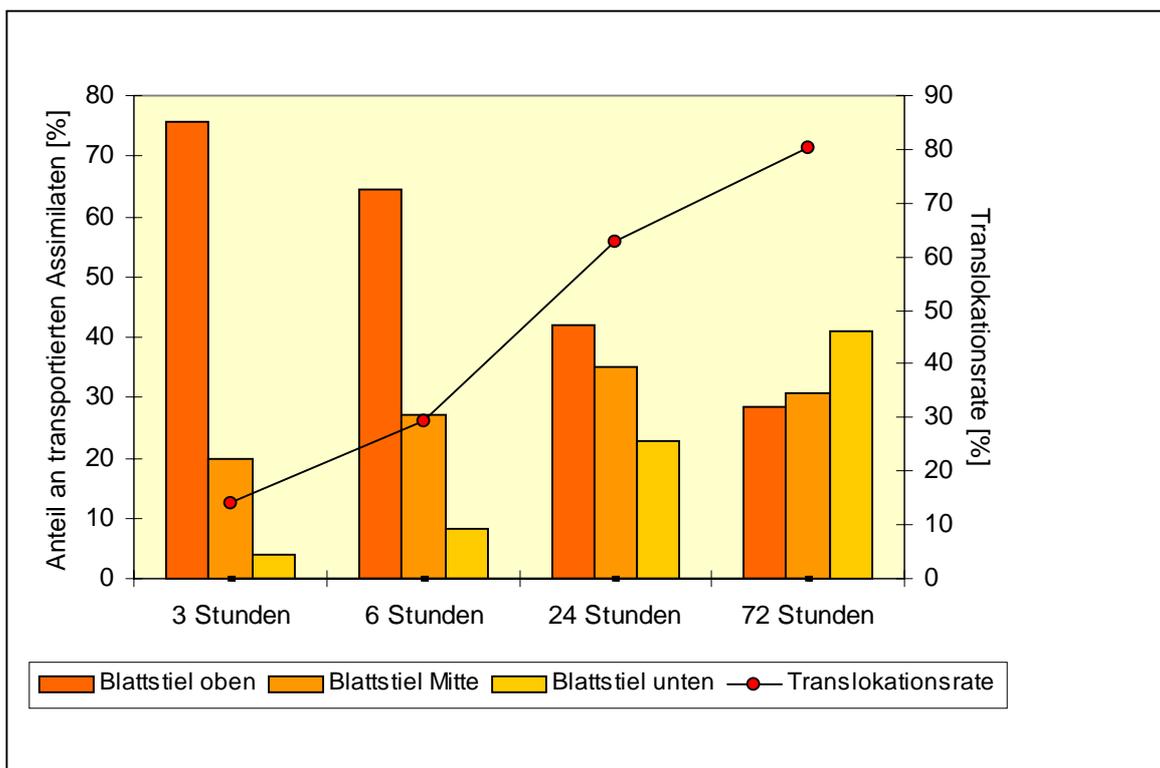
$$\text{Verteilungsmuster (\%)} = \frac{\text{Radioaktivitätsgehalt des Pflanzenabschnittes (dpm)} * 100}{\text{Radioaktivitätsgehalt außerhalb des Fütterungsorgans (dpm)}} \\ \text{(bezogen auf austransportierte Radioaktivität)}$$

### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 Untersuchungen zur Standardisierung des Versuchssystems *Pelargonium zonale* – *Cuscuta reflexa*

##### 3.1.1 Translokation von $^{14}\text{C}$ -markierten Assimilaten in isolierten Blättern von *Pelargonium zonale*

Eine wichtige Voraussetzung für die Durchführung der Untersuchungen war die Etablierung eines Versuchssystems, in dem die Wirtspflanze übersichtliche source-sink-Verhältnisse und einen nur in *einer* Richtung verlaufenden Phloemstrom aufweist. Isolierte Blätter von *Pelargonium zonale* mit 8-10cm langen Blattstielen erfüllten diese Bedingungen. Der beim Abtrennen von der Pflanze normalerweise schnell eintretende Verschluß der Siebröhren wird durch Einstellen der Blattstiele für 30 Minuten in EDTA (10mM EDTA in 10mM MES/NaOH, pH 5,0) verhindert (KING & ZEEVART, 1974). Der



**Abb. 3.1: Isolierte Blätter von *Pelargonium zonale* Translokationsraten und Verteilungsmuster der  $^{14}\text{C}$ -markierten Assimilate nach Applikation von  $^{14}\text{CO}_2$  an die Blattspreite**

$^{14}\text{CO}_2$  wurde für 5 Minuten an die Blattspreite appliziert. Nach Translokationszeiten von 3-72 Stunden wurde der Radioaktivitätsgehalt der methanollöslichen Fraktion der einzelnen Pflanzenabschnitte bestimmt. Der Blattstiel wurde bei der Aufarbeitung in drei Abschnitte gleicher Länge unterteilt. n = 10.

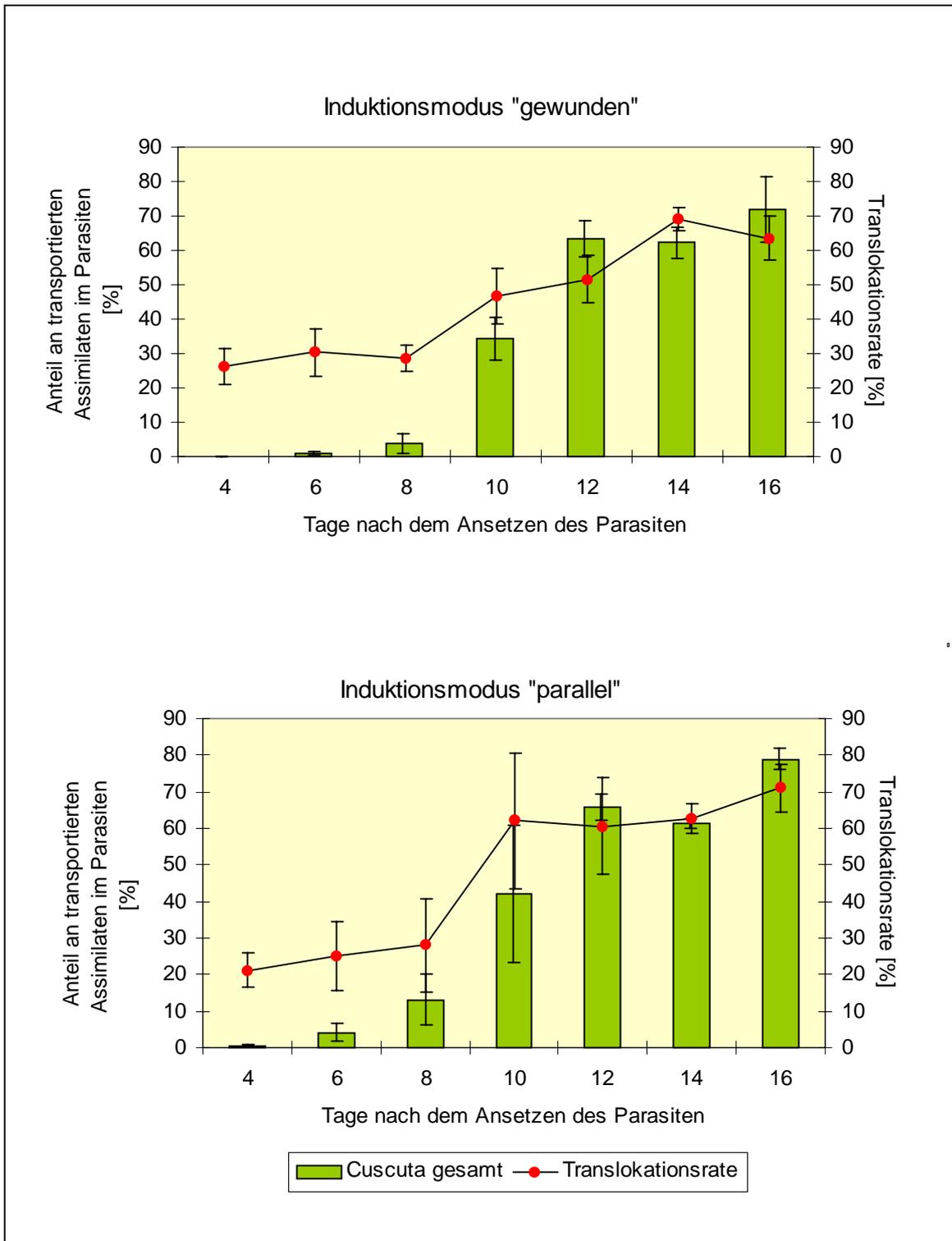
Assimilatstrom bleibt in diesem System über mehrere Tage voll funktionsfähig. Abbildung 3.1 zeigt eine Zusammenstellung von Versuchen, bei denen die Spreiten der isolierten Blätter jeweils für 5 Minuten mit  $^{14}\text{CO}_2$  begast wurden und nach 3, 6, 24 und 72 Stunden Translokationsraten sowie Verteilungsmuster der  $^{14}\text{C}$ -markierten Verbindungen bestimmt wurden. (Die der Abbildung zugrunde liegenden Zahlenwerte siehe Tabelle 4.1 im Tabellenanhang).

Die Translokationsrate nahm im untersuchten Zeitraum deutlich zu und erreichte 72 Stunden nach Pulsbegasung einen Wert von 80,5%. Mit zunehmender Translokationsdauer veränderte sich auch die Verteilung innerhalb des Blattstiels. Während sich nach drei Stunden noch 75,8% der  $^{14}\text{C}$ -markierten Verbindungen im oberen, 19,9% im mittleren und nur 4,1% im unteren Abschnitt befanden, wurden nach 72 Stunden nur noch 28,3% im oberen, aber 30,6% im mittleren und 41,0% im unteren Abschnitt gemessen. Der Anteil an radioaktiv markierten Verbindungen in der Pufferlösung schwankte innerhalb der Versuche stark, lag aber immer unter 0,5%.

### **3.1.2 Ermittlung der Zeitdauer für die Ausbildung eines funktionellen Phloemkontaktes zwischen Wirt und Parasit**

Eine weitere wichtige Voraussetzung für die Durchführung der Untersuchungen war die Anwendung des „parallelen“ Induktionsmodus. Bei dieser von IHL und WIESE (2000) beschriebenen Methode wird das unter natürlichen Bedingungen auftretende Winden des Parasiten um die Organe des Wirtes („gewundener Induktionsmodus“) experimentell unterdrückt und eine Anlage der Haustorien ausschließlich an *einer* Flanke des Blattstieles erzwungen (siehe Abbildung 2.1). Dadurch wird es möglich, bei der Aufarbeitung sowohl Wirt und Parasit als auch parasitiertes und nicht parasitiertes Wirtsgewebe voneinander zu trennen. Die Parasitierung der Blätter erfolgte stets im mittleren Bereich des Blattstieles auf einer Länge von 4-5cm.

Zur Standardisierung der Versuchsbedingungen bestimmten wir in *Pelargonium-Cuscuta*-Systemen mit „gewundenem“ bzw. „parallelen“ Induktionsmodus Translokationsraten und Verteilungsmuster der radioaktiv markierten Assimilate nach Pulsbegasung des Wirtsblattes mit  $^{14}\text{CO}_2$  über einen Zeitraum zwischen 4 und 16 Tage nach Anlegen des Parasiten. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in Abbildung 3.2 dargestellt, die ausführlichen der Abbildung zugrunde liegenden Daten sind in Tabelle 4.2 im Tabellenanhang zusammengefaßt.



**Abb. 3.2: Wirt-Parasit-System *Pelargonium-Cuscuta***  
**Translokationsraten und Anteile der transportierten <sup>14</sup>C-Verbindungen im Parasiten während der Haustorienentwicklung.**

Ansetzen des Parasiten = 0 Tage, 5minütige Begasung der Spreite mit <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>, Translokationszeit 3 Stunden, Bestimmung der Radioaktivität im Methanolextrakt. n = 7.

Die Ergebnisse zeigten bei „parallelem“ Induktionsmodus eine offensichtlich schnellere Kontaktaufnahme zwischen Wirt und Parasit als beim „gewundenen“ Induktionsmodus. Bis zum achten Tag nach dem Anlegen des Parasiten betrug die Translokationsrate in beiden Systemen  $\approx 30\%$ . Von den aus dem Blatt des Wirtes austransportierten  $^{14}\text{C}$ -Assimilaten waren bei „gewundenem“ Induktionsmodus bis zum 6. Tag noch keine signifikanten Mengen im Parasiten nachweisbar, bei „parallelem“ Induktionsmodus betrug der in *Cuscuta* transportierte Anteil am 6. Tag  $4,2 \pm 2,4\%$ .

Am 8. Tag wurden bei gewundenem Induktionsmodus  $3,8 \pm 2,8\%$ , bei „parallelem“ Induktionsmodus jedoch bereits  $13,2 \pm 7,1\%$  der transportierten Assimilate in *Cuscuta* gemessen.

Zwischen dem 8. und 10. Infektionstag stiegen in beiden Versuchsreihen sowohl die Translokationsrate als auch der in den Parasiten transportierte Anteil stark an. So erreichten am 10. Versuchstag die Translokationsrate  $46,8 \pm 8,2\%$  („gewunden“) bzw.  $62,2 \pm 18,6\%$  („parallel“) und der im Parasiten gemessene Anteil an  $^{14}\text{C}$ -Assimilaten  $34,4 \pm 6,3\%$  („gewunden“) bzw.  $42,1 \pm 18,8\%$  („parallel“). Mit der Zunahme des Anteils der transportierten Assimilate im Parasiten ging in beiden Systemen eine Abnahme des Transportes in den Blattstielabschnitt unterhalb der Parasitierung einher.

Ab dem 12. Versuchstag waren in beiden Versuchsreihen übereinstimmende Werte für die Translokationsraten (zwischen 60 und 70%) und für die in *Cuscuta* transportierten Anteile (60 bis 80%) festzustellen, aus denen auf einen funktionellen Phloemkontakt zwischen Wirt und Parasit geschlossen werden konnte.

Anhand dieser Ergebnisse wurden für die folgenden Experimente stets 16 Tage alte Wirt-Parasit-Systeme verwendet.

### **3.1.3 Untersuchung der source - sink Verhältnisse im Wirt - Parasit - System *Pelargonium - Cuscuta* bei Reduktion des Parasiten**

Durch die vorstehenden Versuche konnte gezeigt werden, daß *Cuscuta* nach erfolgreichem Anschluß an die Leitgewebe des Wirtes innerhalb des Wirt-Parasit-Systems (W-P-S) den dominierenden sink darstellt. Bereits drei Stunden nach Pulsbegasung der Blattspreite mit  $^{14}\text{CO}_2$  lagen  $86,8 \pm 2,9\%$  der aus dem Blatt transportierten  $^{14}\text{C}$ -Verbindungen im Parasiten vor. Nach 72 Stunden erhöhte sich der Anteil auf  $97,1 \pm 0,7\%$ . Auch von den zunächst noch im Blattstiel befindlichen Verbindungen wurde im Versuchszeitraum von 72 Stunden der größte Teil in den Parasiten transportiert. Enthielt der Blattstiel nach drei Stunden noch  $13,2\%$  der transportierten  $^{14}\text{C}$ -Assimilate, so waren es nach 72 Stunden nur noch  $2,9\%$ . In den Blattstielabschnitt unterhalb der Parasitierung

gelangte stets nur ein sehr geringer Anteil. Die Werte lagen zwischen 0,2 und 0,8%.

Dieser starke Stoffentzug durch *Cuscuta* bleibt auch dann bestehen, wenn ihre wachsende Spitze entfernt wird und die Achse schrittweise bis auf die in den Blattstiel eindringenden Haustorien verkürzt wird. Alle Manipulationen am Parasiten wurden 24 Stunden vor Applikation des  $^{14}\text{CO}_2$  an die Wirtspflanze durchgeführt. Jeder Versuchsansatz umfaßte 6 Wirt-Parasit-Systeme.

Abbildung 3.3 zeigt eine Zusammenfassung der Ergebnisse dieser Experimente, die der Graphik zugrunde liegenden Werte sind in Tabelle 4.3 im Anhang dargestellt.

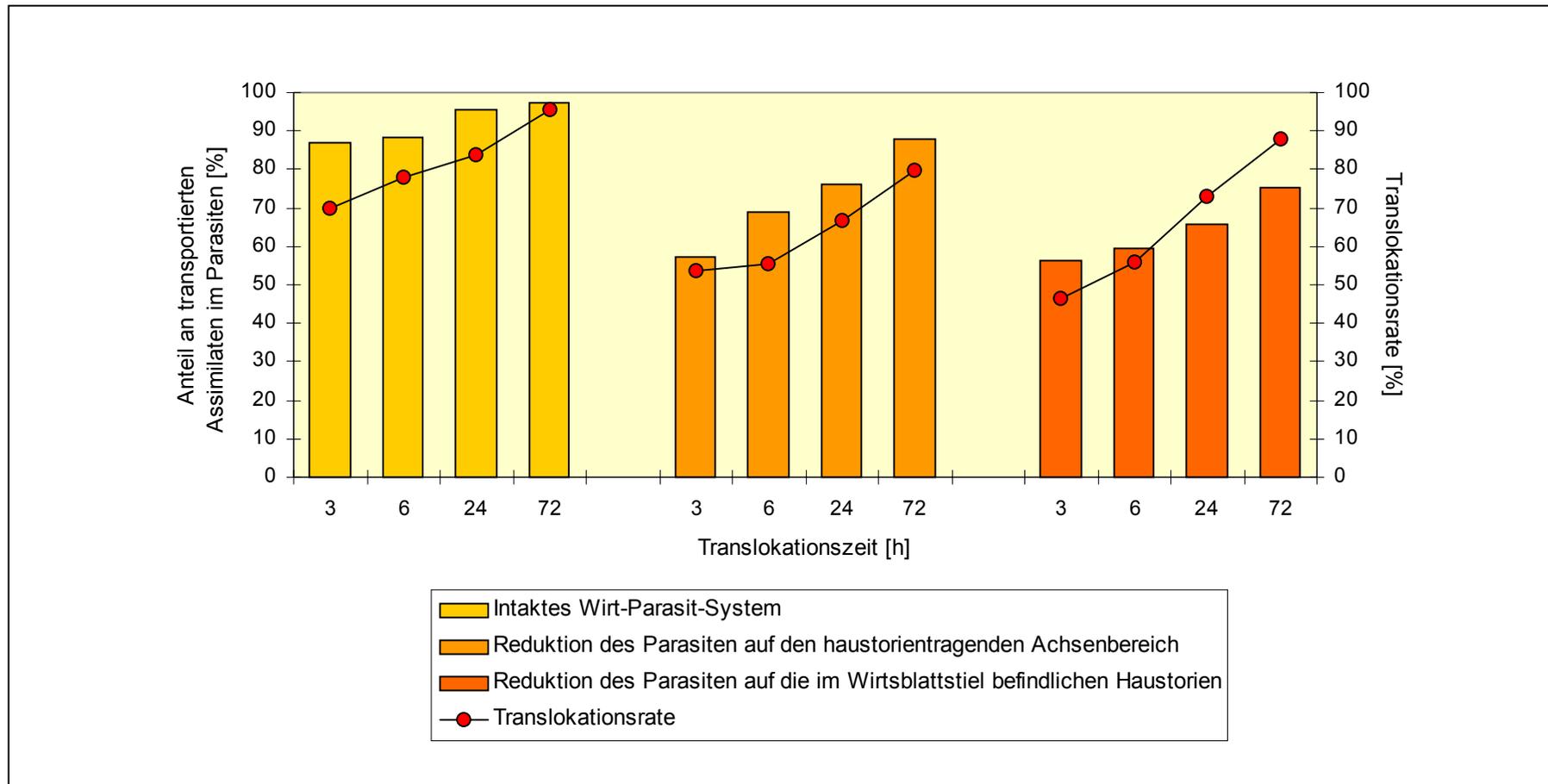
Bei der Verkürzung des Parasiten von durchschnittlich 60cm auf die 4cm lange haustorientragende Achse, wobei die wachsenden und ein großer Teil der speichernden Gewebe entfernt wurden, war nach drei Stunden der Anteil der im parasitierten Blattstielabschnitt verbleibenden Radioaktivität mit  $29,8 \pm 5,8\%$  größer als im intakten System, wo  $5,9 \pm 1,1\%$  gemessen wurden. Der in die verkürzte *Cuscuta* transportierte Anteil war dagegen verglichen mit dem intakten System kleiner. Er betrug zu diesem Zeitpunkt nur  $57,1 \pm 8,5\%$ , im intakten System waren es bereits  $86,7 \pm 3,0\%$ . Trotz der Verkürzung stellte *Cuscuta* aber den dominierenden sink dar. Der in den Parasiten transportierte Anteil nahm mit zunehmender Versuchszeit ständig zu. Nach 72 Stunden lagen  $87,7 \pm 2,3\%$  der transportierten  $^{14}\text{C}$ -Assimilate im Parasiten vor. Die Translokationsrate stieg von  $36,5 \pm 1,3\%$  nach drei Stunden auf  $79,6 \pm 7,6\%$  nach 72 Stunden.

Wenn auch noch die dem Blattstiel parallel anliegende Achse des Parasiten abgetrennt wurde, so daß nur die im Blattstiel befindlichen Haustorien übrig blieben, befand sich nach allen untersuchten Translokationszeiten der Hauptanteil der aus dem Blatt austransportierten radioaktiv markierten Verbindungen im parasitierten Blattstielabschnitt. Vergleicht man die Verteilung der  $^{14}\text{C}$ -Assimilate mit der in nicht parasitierten Blattstielen, so sind deutliche Unterschiede in den Verteilungsmustern erkennbar. Tabelle 3.1 zeigt diesen Vergleich für eine Translokationsdauer von 72 Stunden. Der mittlere Blattstielabschnitt mit den Haustorien enthält  $75,3 \pm 4,7\%$  der radioaktiv markierten Verbindungen, im nicht parasitierten Blattstiel sind es nur  $30,6 \pm 1,9\%$ . Die oberhalb und unterhalb der Parasitierung befindlichen Abschnitte, für die in nicht parasitierten Blattstielen Werte mit  $28,3 \pm 1,9\%$  bzw.  $41,0 \pm 3,5\%$  gemessen wurden, werden bei einer Parasitierung mit *Cuscuta* wesentlich schlechter versorgt. In sie gelangen unter diesen Bedingungen nur  $14,0 \pm 3,6\%$  bzw.  $10,8 \pm 2,1\%$  der Verbindungen. Zu allen Versuchszeiten wies der mittlere, die Haustorien enthaltende Abschnitt den größten Gehalt an radioaktiven Substanzen auf.

**Abb. 3.3: Wirt-Parasit-System *Pelargonium-Cuscuta***

**Translokationsraten und Anteile der in den Parasiten transportierten radioaktiv markierten Assimilate bei unterschiedlich starker Reduktion der *Cuscuta*-Achse**

5minütige Applikation von  $^{14}\text{CO}_2$  an die Blattspreite des Wirtes. Translokationszeit 3-72 Stunden. Methanolextraktion ohne Fraktionierung. Alter der Wirt-Parasit-Systeme 16 Tage. Die Manipulationen am Parasiten wurden 24 Stunden vor Versuchsbeginn vorgenommen. n = 6.



**Tab. 3.1: Verteilungsmuster der transportierten  $^{14}\text{C}$ -Verbindungen in isolierten Blattstielen von *Pelargonium zonale* mit und ohne Haustorien nach Applikation von  $^{14}\text{CO}_2$  an die Blattspreite und einer Translokationszeit von 72 Stunden**

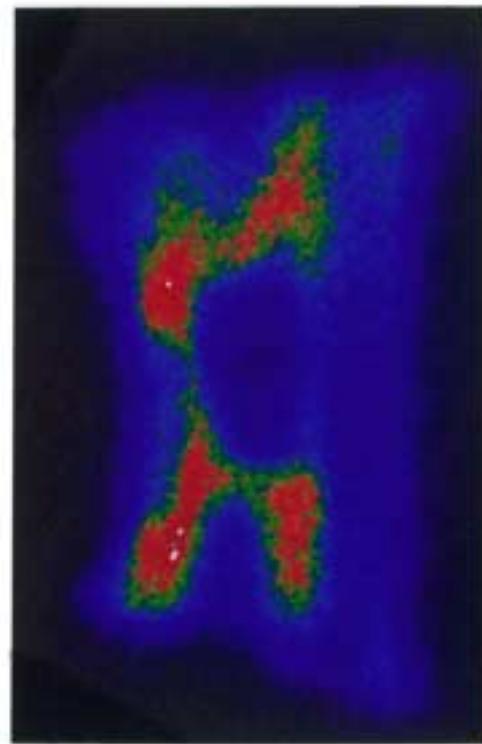
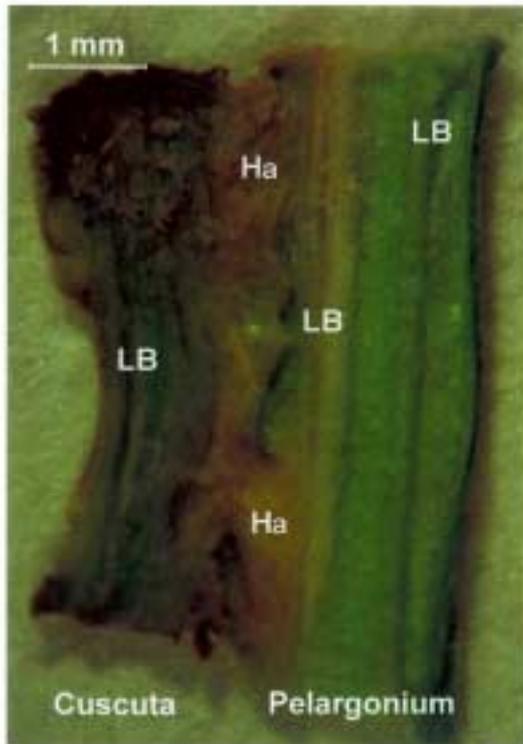
Bei den parasitierten *Pelargonium*-Blättern erfolgte die Abtrennung des Parasiten 24 Stunden vor Versuchsbeginn. Nur die Haustorien verblieben im mittleren Abschnitt des Blattstieles. Die fünfminütige Applikation von  $^{14}\text{CO}_2$  erfolgte an die Blattspreite des Wirtes; nach einer Translokationszeit von 72 Stunden wurde die Radioaktivität der methanollöslichen Fraktion der einzelnen Pflanzenabschnitte bestimmt. n = 10. Mittelwerte  $\pm$  SF 95% Konfidenzgrenzen.

Abschnitt	Prozentualer Anteil an transportierten $^{14}\text{C}$ -Verbindungen	
	<i>Pelargonium</i> - <i>Cuscuta</i>	<i>Pelargonium</i> + <i>Cuscuta</i>
Blattstiel oben	28,3 $\pm$ 1,9	14,0 $\pm$ 3,6
Blattstiel Mitte $\pm$ Haustorien	30,6 $\pm$ 1,9	<b>75,2 <math>\pm</math> 4,7</b>
Blattstiel unten	41,0 $\pm$ 3,5	10,8 $\pm$ 2,1

Da bei der Radioaktivitätsmessung stets die Markierung des *gesamten* Gewebes bestimmt wird, sagen die Ergebnisse der vorstehenden Experimente nichts aus über die Verteilung der radioaktiven Verbindungen zwischen Wirt- und Parasitgeweben in dem infizierten mittleren Blattstielabschnitt. Um Auskunft über die Lokalisation der Substanzen zu erhalten, wurden parallel mit *Cuscuta* infizierte *Pelargonium*-Blattstiele 3 Stunden nach Pulsbegasung mit  $^{14}\text{CO}_2$  im mittleren Bereich des Blattstieles längs geschnitten und nach Gefriertrocknung auf einen Screen gelegt, der anschließend mit dem Phosphorimager ausgewertet wurde. Die unterschiedlichen Konzentrationen der im Gewebe enthaltenen radioaktiven Verbindungen wurden als Fehlfarbenbild dargestellt (Abb. 3.4). Aus den Bildern ist zu erkennen, daß der Stoffübertritt vom Wirt zum Parasiten offenbar lokal sehr begrenzt an der Kontaktstelle der Haustorien erfolgt. Nach einer dreistündigen Translokationszeit waren die beiden quer geschnittenen Haustorien und die Leitbündel der *Cuscuta*-Achse eindeutig als die Orte der höchsten Konzentration an radioaktiven Verbindungen zu erkennen. Die umgebenden parenchymatischen Gewebe von Wirt und Parasit wiesen dagegen nur eine geringe Markierung auf. Auch die Leitbündel des Wirtes hoben sich nur schwach vom umgebenden Parenchym ab.

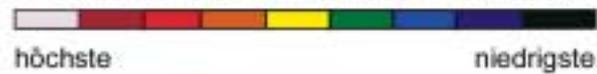
Histologisches Bild, Handschnitt

Lokalisation der  $^{14}\text{C}$ -Verbindungen  
mittels Phosphorimager



LB - Leitbündel  
Ha - Haustorium

Konzentration radioaktiv markierter Verbindungen

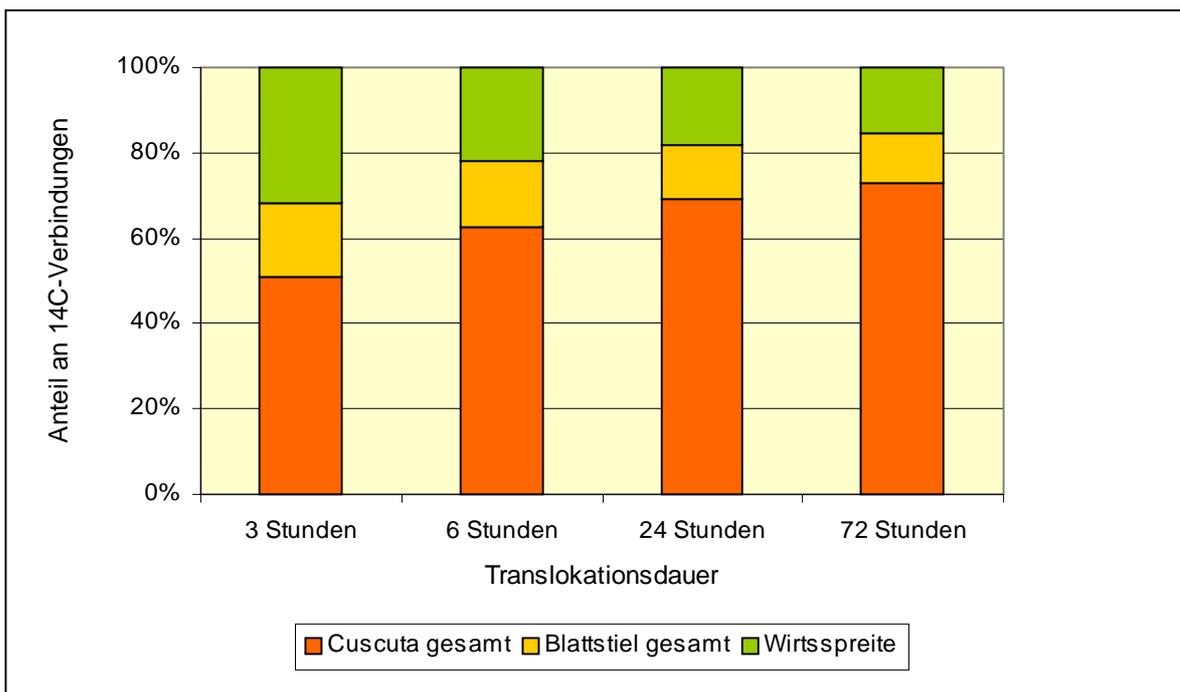


**Abb.3.4: Wirt-Parasit-System *Pelargonium-Cuscuta***

Lokalisation von  $^{14}\text{C}$ -Verbindungen in der Kontaktzone zwischen Wirt und Parasit nach Applikation von  $^{14}\text{CO}_2$  (5min) an die Spreite des Wirtes. Parasitierung mit *Cuscuta* im mittleren Bereich des Blattstieles (parallele Induktion), Nachweis der Radioaktivität mit dem Phosphorimager.

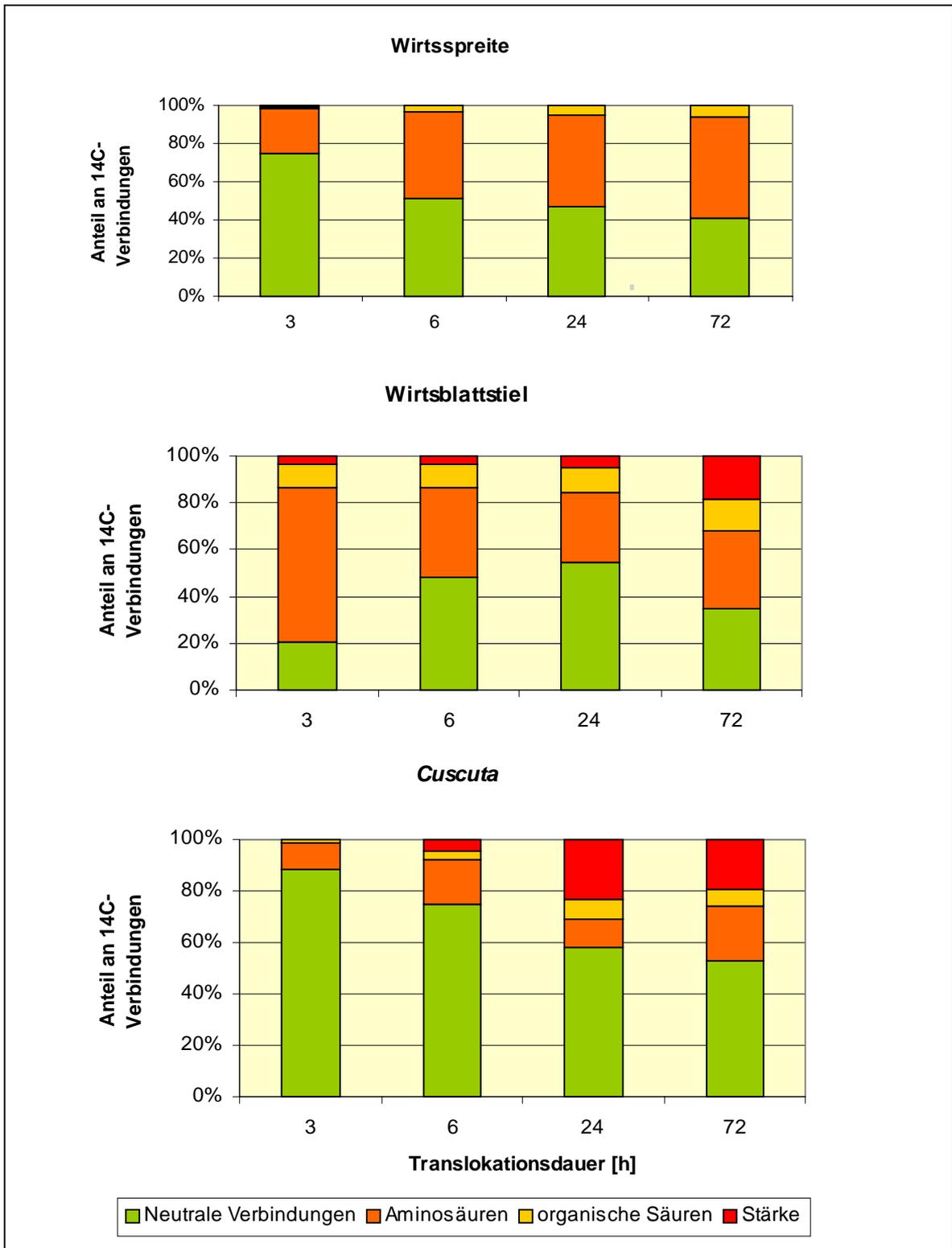
### 3.2 Charakterisierung der in *Cuscuta* transportierten $^{14}\text{C}$ -Verbindungen

Um Aussagen über die chemische Struktur der aus der Wirtspflanze in den Parasiten transportierten Verbindungen zu erhalten, wurden die Wirt-Parasit-Systeme 3, 6, 24 und 72 Stunden nach Pulsbegasung der Spreiten mit  $^{14}\text{CO}_2$  in definierte Abschnitte zerteilt, die getrennt aufgearbeitet wurden. Der methanolische Extrakt jedes Abschnitts wurde vor der Radioaktivitätsmessung über Ionenaustauscher in Aminosäuren, organische Säuren und neutrale Verbindungen (Zucker) aufgetrennt. Die Menge an radioaktiv markierter Stärke konnte aus dem methanolunlöslichen Extraktionsrückstand bestimmt werden. Durch Addition der für die einzelnen Fraktionen ermittelten Meßwerte wurde der Gesamtgehalt an  $^{14}\text{C}$ -Verbindungen im jeweiligen Pflanzenabschnitt erhalten. Auf der Grundlage dieser Meßwerte berechnete Verteilungsmuster (Abb. 3.5) waren mit den Ergebnissen der in Kapitel 3.1.1 beschriebenen Versuche vergleichbar, bei denen die Gesamtradioaktivität ohne Fraktionierung für die Berechnungen herangezogen wurde.



**Abb. 3.5: Wirt-Parasit-System *Pelargonium-Cuscuta***  
**Prozentuale Verteilung der radioaktiv markierten Assimilate im Wirt-Parasit-System nach unterschiedlich langer Translokationsdauer.**

Die dargestellten Werte sind Summen aus den Meßwerten für die einzelnen Fraktionen (neutrale Verbindungen, Aminosäuren und organische Säuren) und dem Meßwert für die Stärkebestimmung. Es wurden Mischproben aus jeweils 4 Wirt-Parasit-Systemen untersucht.



**Abb.3.6: Wirt-Parasit-System *Pelargonium-Cuscuta***

**Prozentualer Anteil der einzelnen Fraktionen an der Gesamtradioaktivität in definierten Abschnitten des Wirt-Parasit-Systems nach  $^{14}\text{CO}_2$ -Begasung der Wirtsspreite nach unterschiedlich langen Translokationszeiten**

Applikation von  $^{14}\text{CO}_2$  an die Wirtsspreite. Analyse der löslichen markierten Verbindungen im alkoholischen Extrakt mittels Ionenaustauscher. Stärkebestimmung aus dem Pellett. Alle Fraktionen eines Abschnittes = 100%. n = 5.

Abbildung 3.6 zeigt die im Wirtsblatt, im Blattstiel und im Parasiten nach unterschiedlich langen Translokationszeiten vorliegende Verteilung der Radioaktivität zwischen den einzelnen Fraktionen (Neutrale Verbindungen, Aminosäuren, organische Säuren und Stärke).

In der Blattspreite wurde nach drei Stunden das aufgenommene  $^{14}\text{CO}_2$  hauptsächlich in Form von neutralen Verbindungen (74,5%) und Aminosäuren (23,6%) wiedergefunden. Die Anteile an organischen Säuren und Stärke waren sehr gering (1,4 bzw. 0,5%). Nach 6 Stunden zwischen Pulsbegasung und Aufarbeitung der Proben hatte sich das Verhältnis zwischen neutralen Verbindungen und Aminosäuren zugunsten der Aminosäuren verschoben. Ihr Anteil betrug 44,9%, der der neutralen Verbindungen 51,4%. Diese Entwicklung dauerte während des gesamten untersuchten Zeitraumes an. Nach 72 Stunden betrug der Anteil an markierten Aminosäuren in der Spreite 53,7%, an neutralen Zuckern 40,6%, an organischen Säuren 5,6%. Zum gleichen Zeitpunkt konnte fast keine radioaktiv markierte Stärke in der Spreite gemessen werden (0,1%).

Im Blattstiel des Wirtes lagen nach 3 Stunden hauptsächlich radioaktiv markierte Aminosäuren vor (65,7% der Gesamtradioaktivität). Der Anteil an organischen Säuren betrug 10,4%. Im Verlaufe von 72 Stunden, in denen gleichzeitig Prozesse der Translokation und des Metabolismus stattfanden, kam es zu signifikanten Verschiebungen innerhalb des Fraktionierungsmusters. Der Anteil an neutralen Verbindungen erhöhte sich nach 24 Stunden auf 54,6%, ging aber nach 72 Stunden wieder auf 34,4% zurück. Dafür stieg der Stärkeanteil von 4,8% nach 24 Stunden auf 18,6% nach 72 Stunden. Der Anteil an radioaktiv markierten Aminosäuren blieb relativ konstant, er betrug zwischen 38,4% nach 6 Stunden und 33,7% nach 72 Stunden. Auch der Anteil der organischen Säuren unterlag während des betrachteten Zeitraumes keiner signifikanten Schwankung, er betrug stets  $\approx 10\%$ .

**Tab. 3.2: *Cuscuta reflexa*  
Verhältnis zwischen  $^{14}\text{C}$ -markierten Zuckern (neutrale Fraktion) und  $^{14}\text{C}$ -markierter Stärke in den einzelnen Abschnitten der *Cuscuta*-Achse**

Die fünfminütige Applikation von  $^{14}\text{CO}_2$  erfolgte an die Blattspreite des Wirtes; nach einer Translokationszeit von 24 Stunden wurde die Radioaktivität der methanollöslichen neutralen Fraktion und der Stärke in den einzelnen *Cuscuta*-Abschnitten bestimmt.  $n = 10$ .

Abschnitt	Verhältnis zwischen $^{14}\text{C}$ -Zuckern und $^{14}\text{C}$ -Stärke
Haustorienbildende Achse	94,8 : 5,2
Freie Achse	95,5 : 4,5
<i>Cuscuta</i> -Spitze	87,0 : 13,0

Im Parasiten lagen die  $^{14}\text{C}$ -Verbindungen nach drei Stunden zu 88,7% als neutrale Fraktion (Zucker), zu 9,7% als Aminosäuren und zu 1,5% als organische Säuren vor. Der Anteil der Stärke an der  $^{14}\text{C}$ -Markierung betrug zu diesem Zeitpunkt weniger als 1%. Bei Verlängerung der Translokationszeit nahm der Anteil der neutralen Fraktion an der Gesamtradioaktivität ab. Parallel dazu nehmen die Anteile der Aminosäuren, der organischen Säuren und besonders der Stärke zu. Nach 72 Stunden lagen 20% der radioaktiv markierten Verbindungen als Stärke vor (Abb. 3.6). Damit zeigt *Cuscuta* ein für sink-Organen typisches Merkmal. Die Speicherung von Stärke erfolgte hauptsächlich im 5cm von der Spitze entfernten apikalen Bereich. Nach einer Translokationszeit von 24 Stunden betrug in diesem Abschnitt das Verhältnis zwischen der Radioaktivität in der löslichen Zuckerfraktion und in der Stärkefraktion 87:13 (Tabelle 3.2), während in dem haustorienbildenden Abschnitt und in der freien Achse zwischen Kontaktbereich und Spitzenregion die Zucker rund 95% der Kohlenhydratfraktion ausmachten.

### **3.2.1 Dünnschichtchromatographische Analyse der Zuckerfraktion in einzelnen Abschnitten des Wirt-Parasit-Systems *Pelargonium-Cuscuta* nach Applikation von $^{14}\text{C}$ -Saccharose an die Spreite des Wirtes**

Für diese Experimente wurde  $^{14}\text{C}$ -markierte Saccharose – die Haupttransportform der Assimilate im Wirt-Parasit-System (JACOB & NEUMANN, 1968; HAUPT, 1994) – durch Auftropfen an die Blattspreite von *Pelargonium* appliziert. Im Vergleich zum Begasen der Blattspreiten mit  $^{14}\text{CO}_2$  zeichnet sich diese Methode durch einen geringeren apparativen Aufwand aus. Tabelle 3.3 zeigt einen Vergleich der nach Begasung mit  $^{14}\text{CO}_2$  bzw. nach Auftropfen von  $^{14}\text{C}$ -Saccharose erhaltenen Translokationsraten und Verteilungsmuster der  $^{14}\text{C}$ -markierten Verbindungen in parasitierten und nicht parasitierten Blättern von *Pelargonium zonale*. Durch die Parasitierung trat in beiden Versuchsreihen eine Erhöhung der Translokationsrate im Vergleich zu nicht parasitierten Blättern auf. Sie war besonders deutlich bei den Auftropfversuchen, wo eine Steigerung von 3,8 auf 30,6% gemessen wurde. Insgesamt lag die Translokationsrate bei den Begasungsexperimenten mit 69,9% jedoch höher als bei den Auftropfversuchen mit 30,6%. In beiden Versuchsreihen stellte der Parasit den dominierenden „sink“ innerhalb des Wirt-Parasit-Systems dar.

**Tab. 3.3: Wirt-Parasit-System *Pelargonium-Cuscuta*  
Vergleich der Translokationsraten und Verteilungsmuster der transportierten <sup>14</sup>C-Verbindungen in parasitierten und nicht parasitierten Blättern von *Pelargonium zonale* nach Applikation von <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> bzw. <sup>14</sup>C-Saccharose an die Blattspreiten des Wirtes**

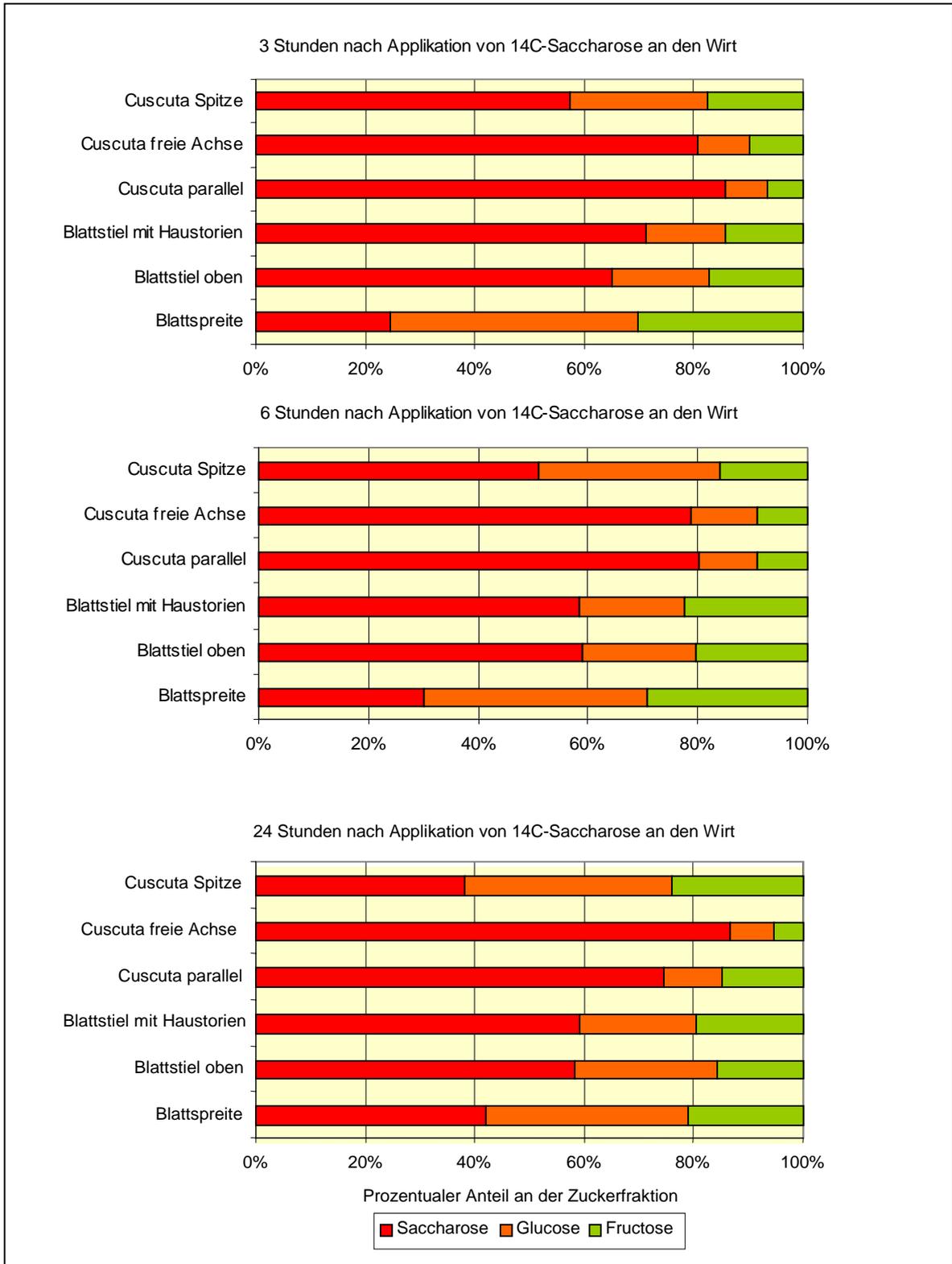
Die Applikation von <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> (5 Minuten) und <sup>14</sup>C-Saccharose (3 Stunden) erfolgte an die Blattspreiten des Wirtes; nach einer Translokationszeit von 3 Stunden wurde die Radioaktivität der methanollöslichen Fraktion der einzelnen Pflanzenabschnitte bestimmt. n = 10. Mittelwert ± SF 95% Konfidenzgrenzen.

Abschnitt	Prozentualer Anteil an transportierten <sup>14</sup> C-Verbindungen			
	Applikation von <sup>14</sup> CO <sub>2</sub>		Applikation von <sup>14</sup> C-Saccharose	
	- Parasit	+ Parasit	- Parasit	+ Parasit
Blattstiel oberhalb der Parasitierung	<b>75,9 ± 5,3</b>	<b>6,5 ± 2,4</b>	<b>68,3 ± 4,7</b>	<b>6,4 ± 1,5</b>
Blattstiel ± Haustorien	<b>19,0 ± 4,1</b>	<b>5,9 ± 1,1</b>	<b>21,9 ± 3,8</b>	<b>22,9 ± 2,1</b>
Blattstiel unterhalb der Parasitierung	<b>5,1 ± 0,6</b>	<b>0,8 ± 0,7</b>	<b>9,8 ± 3,2</b>	<b>1,2 ± 0,6</b>
<i>Cuscuta</i>	-----	<b>86,7 ± 2,9</b>	-----	<b>69,4 ± 5,8</b>
Puffer	<b>0,02 ± 0,01</b>	<b>0,05 ± 0,02</b>	<b>0,03 ± 0,01</b>	<b>0,02 ± 0,01</b>
Translokationsrate	<b>14,2 ± 6,9</b>	<b>69,9 ± 11,4</b>	<b>3,8 ± 0,2</b>	<b>30,6 ± 3,7</b>

Die Aufarbeitung der Proben erfolgte 3, 6 und 24 Stunden nach Applikation von <sup>14</sup>C-Saccharose an die Blattspreite des Wirtes. Die methanolischen Extrakte der einzelnen Abschnitte wurden mittels Ionenaustauscher fraktioniert und die neutralen Fraktionen (Zucker) mittels Dünnschichtchromatographie weiter aufgetrennt. Anschließend wurden die Dünnschichtplatten auf einen Screen aufgelegt und mit dem Phosphorimager quantitativ ausgewertet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.7 dargestellt.

Nach 3, 6 und 24 Stunden konnten keine qualitativen Unterschiede zwischen den Zuckerfraktionen der einzelnen Abschnitte festgestellt werden. Stets waren nur Saccharose, Glucose und Fructose radioaktiv markiert. Sowohl im parasitierten als auch im nicht parasitierten Blattstielabschnitt stellte Saccharose den Hauptzucker dar. Die quantitativen Unterschiede zwischen beiden Abschnitten waren in keinem Fall signifikant und geben keinen Hinweis auf eine Spaltung der Saccharose beim Übergang aus dem Wirt in den Parasiten.

Sowohl der dem Blattstiel parallelen als auch in der freien *Cuscuta*-Achse lag der prozentuale Anteil von Saccharose am Gesamtzucker unabhängig vom betrachteten Zeitraum zwischen 75 und 85%. Damit konnte für den Parasiten bestätigt werden, daß



**Abb. 3.7: Wirt-Parasit-System *Pelargonium-Cuscuta***  
**Dünnschichtchromatographische Analyse der neutralen Zuckerfraktion in**  
**Abschnitten des Wirt-Parasit-Systems *Pelargonium-Cuscuta***

Aufarbeitung von Mischproben aus je 4 W-P-S je Zeitpunkt (3, 6 und 24 Stunden). Auftrennung der radioaktiv markierten neutralen Verbindungen durch Dünnschichtchromatographie. Dünnschichtchromatogrammes wurden für 24 Stunden an einen Screen gelegt und anschließend mit dem Phosphorimager quantitativ ausgewertet.

Saccharose die Hauptform der transportierten Zucker darstellt.

In der Spitze der *Cuscuta*-Achse traten mit zunehmender Versuchsdauer vermehrt Monosaccharide auf. Nach drei Stunden lag der Anteil von Glucose und Fructose am Gesamtzucker bei 25,3% bzw. 17,4%. Im Verlaufe von 24 Stunden nahm ihr Anteil zu, für Glucose betrug er zu diesem Zeitpunkt 37,7%, für Fructose 24,1%.

Für den unteren Blattstielabschnitt können keine Angaben gemacht werden, da der Gehalt an radioaktiv markierten Verbindungen unterhalb der Empfindlichkeitsgrenze des Screens lag.

### **3.3 Enzymbestimmungen**

#### **3.3.1 Bestimmung der Invertase-Aktivität in definierten Abschnitten des W-P-S Pelargonium-*Cuscuta***

Zur Klärung der Frage, ob eine zellwandgebundene saure Invertase am Übertritt von Saccharose aus dem Wirt in den Parasiten beteiligt ist - wie das von WOLSWINKEL (1977) postuliert wurde – verglichen wir die Aktivität dieses Enzyms in nicht parasitierten und parasitierten Blattstielen von 16 Tage alten Wirt-Parasit-Systemen, in denen nach unseren Untersuchungen (Kapitel 3.1.2) ein funktioneller Kontakt zwischen Wirt und Parasit ausgebildet war. Die Bestimmung erfolgte in zwei methodischen Ansätzen. Nach WOLSWINKEL (1977), im folgenden als in-vivo-Bestimmung bezeichnet, werden in dünne Scheiben zerschnittene Gewebe nach Freiwaschen des apoplastischen Raumes von Zuckern mit Saccharose inkubiert. Die Menge der nach definierter Zeit aus ihr gebildeten Glucose ist ein Maß für die Enzymaktivität.

Nach WEBER et al. (1995 b;1996b), im folgenden als in-vitro-Bestimmung bezeichnet, wird das pflanzliche Material in eine cytosolische und eine Zellwandfraktion geteilt, welche verschiedene Invertasen enthalten. Für die zellwandgebundene saure Invertase wird die Enzymaktivität aus dem Glucoseumsatz des Zellwandmaterials bestimmt, während bei den löslichen Invertasen die cytosolische Fraktion für die Enzymbestimmung verwendet wird.

Um eine eindeutige Trennung von parasitierten und nicht parasitierten Blattstielabschnitten bei der Aufarbeitung zu erreichen und Haustorien annähernd gleichen Entwicklungsstadiums zu untersuchen, erfolgte die Parasitierung der Blattstiele im „parallelen“ Induktionsmodus (siehe Kapitel 2.1.3). Ein Einfluß des dabei verwendeten Klebebandes auf die Enzymaktivität konnte durch Abkleben entsprechender Abschnitte an den nicht parasitierten Blattstielen ausgeschlossen werden.

### In-vivo Bestimmung der Aktivität der sauren zellwandgebundenen Invertase

Sowohl die nicht parasitierten als auch die parasitierten Blattstiele zeigten einen Gradienten in der Enzymaktivität. Die Aktivität im oberen und mittleren Abschnitt mit oder ohne Haustorien war signifikant höher als im unteren Abschnitt. Die zwischen den beiden oberen Abschnitten gemessenen Unterschiede waren dagegen nicht signifikant.

Eine Parasitierung der Blattstiele mit *Cuscuta* führte in allen Abschnitten zu einer geringen Erhöhung der Invertaseaktivität. Die Unterschiede gegenüber nicht parasitierten Blattstielen waren jedoch nicht signifikant (siehe Tabelle 3.4).

Innerhalb der *Cuscuta*-Achse wurden deutliche Unterschiede in der Invertaseaktivität gemessen. Der dem Blattstiel anliegende haustorienbildende Abschnitt unterscheidet sich mit einem Wert von  $32,1 \pm 1,9$  nmol Glu/mg FM\*min in der Enzymaktivität nicht von dem parasitierten Blattstielgewebe ( $33,8 \pm 2,5$  nmol Glu/mg FM\*min), eine deutlich geringere Enzymaktivität besitzt der anschließende freie Achsenabschnitt ( $12,3 \pm 1,0$  nmol Glu/mg FM\*min). Er dient hauptsächlich dem Transport der vom Wirt aufgenommenen Substanzen in die wachsende Spitze. Die Spitzenzone selbst weist die höchste Enzymaktivität auf.

**Tab. 3.4: Wirt-Parasit-System *Pelargonium-Cuscuta***

#### In-vivo-Bestimmung der Aktivität der zellwandgebundenen sauren Invertase

Von 1mm dünnen Gewebescheiben wurde der apoplastische Raum durch 30minütiges Schütteln in 10mM MES, (pH 4,7) freigewaschen. Anschließend erfolgte eine dreistündige Inkubation in saccharosehaltigem Medium (10mM MES + 10mM Saccharose, pH 4,7). Die Spaltung von Saccharose in Glucose und Fructose im Inkubationsmedium wurde mittels enzymatischer Bestimmung gemessen. n = 10. Mittelwert  $\pm$  SF 95% Konfidenzgrenzen.

Abschnitt	Invertaseaktivität [nmol Glu/mg FM*min]	
	<i>Pelargonium</i> – <i>Cuscuta</i>	<i>Pelargonium</i> + <i>Cuscuta</i>
Blattstiel oberhalb der Haustorien	$29,1 \pm 3,3$	$37,7 \pm 2,6$
Blattstiel Mitte $\pm$ Haustorien	$26,1 \pm 3,1$	$33,8 \pm 2,5$
Blattstiel unterhalb der Haustorien	$15,0 \pm 2,4$	$21,4 \pm 4,4$
<i>Cuscuta</i> -Achse parallel	—————	$32,1 \pm 1,9$
freie <i>Cuscuta</i> -Achse	—————	$12,3 \pm 1,0$
<i>Cuscuta</i> -Spitze	—————	$98,5 \pm 7,3$

## In-vitro Bestimmung der Aktivität der sauren zellwandgebundenen Invertase

Die in-vitro-Bestimmung ergab das gleiche Muster der Aktivitätsverteilung: sowohl innerhalb des nicht parasitierten als auch des parasitierten Blattstieles nahm die Enzymaktivität von oben nach unten ab. Zwischen parasitierten und nicht parasitierten Blattstielen konnten keine Unterschiede in der Enzymaktivität nachgewiesen werden. Übereinstimmend wurde für die Spitze der *Cuscuta* die höchste Enzymaktivität gemessen. Von der in-vitro-Bestimmung abweichend waren die Ergebnisse für die beiden anderen Parasitenabschnitte. Bei der in-vivo-Bestimmung wurde die geringste Enzymaktivität im mittleren, bei der in-vitro-Bestimmung in dem haustorientragenden Achsenabschnitt gemessen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.5 zusammengefaßt.

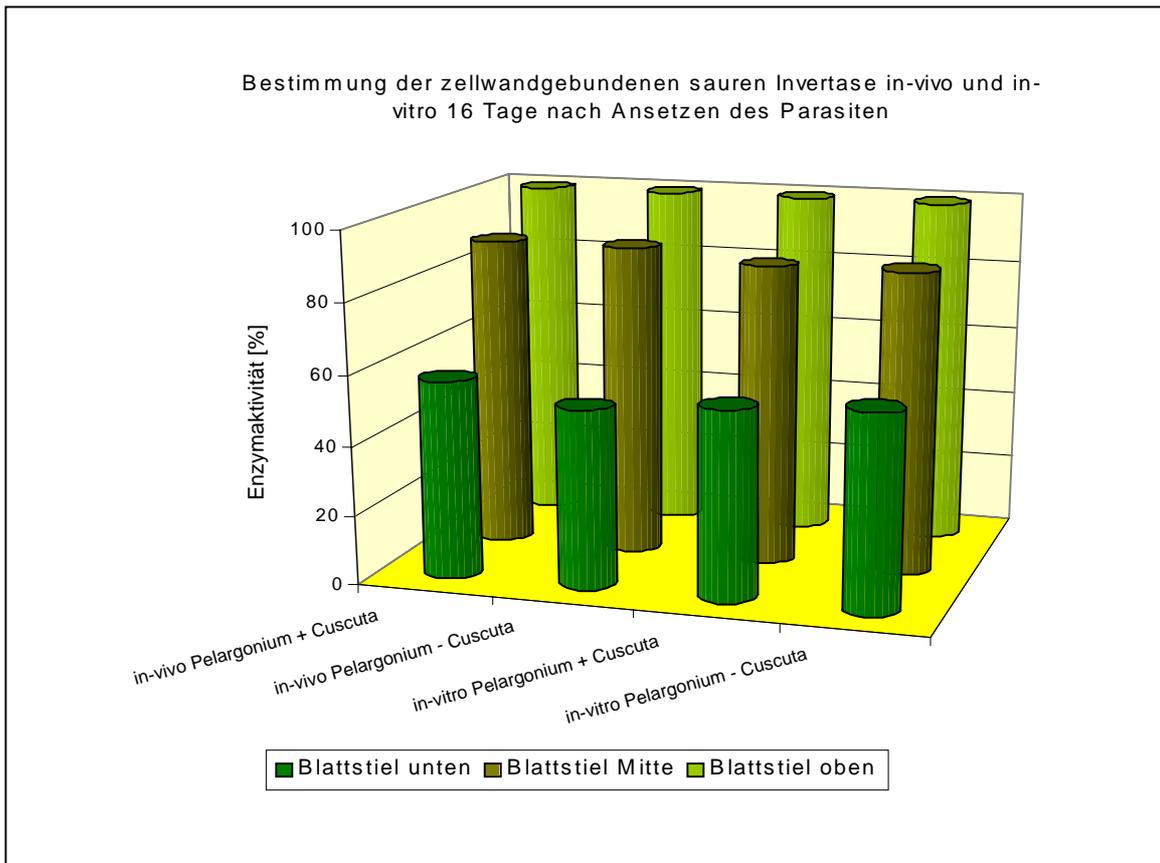
**Tab.3.5: Wirt-Parasit-System *Pelargonium-Cuscuta*  
In-vitro-Bestimmung der Aktivität der sauren zellwandgebundenen Invertase in definierten Abschnitten im parasitierten und nicht parasitierten Blattstiel 16 Tage nach Ansetzen von *Cuscuta***

Bei den nicht parasitierten Blattstielen wurde der mittlere Abschnitt des Blattstieles für 2 Wochen mit Klebeband abgedeckt, um dem Wirt-Parasit-System entsprechende Bedingungen zu schaffen. Von den definierten Abschnitten wurden die Zellwände gewonnen und anschließend in saccharosehaltigem Medium inkubiert. Der Gehalt an Glucose im Inkubationsmedium wurde mittels enzymatischen Tests bestimmt. Mischproben aus 5 Blattstielen.

Abschnitt	Invertaseaktivität [nmol Glu/mg ZW*min]	
	<i>Pelargonium</i> - <i>Cuscuta</i>	<i>Pelargonium</i> + <i>Cuscuta</i>
Blattstiel oberhalb der Haustorien	45	44
Blattstiel Mitte ± Haustorien	39	38
Blattstiel unterhalb der Haustorien	26	24
<i>Cuscuta</i> -Achse parallel	_____	4
Freie <i>Cuscuta</i> -Achse	_____	26
<i>Cuscuta</i> -Spitze	_____	176

Auf Grund der sehr unterschiedlichen methodischen Ansätze der in-vivo- und der in-vitro-Nachweismethode lassen sich die ermittelten Glucoseumsätze nicht direkt miteinander vergleichen. Um diese Werte trotzdem gegenüberstellen zu können, wurden in beiden Versuchsreihen die Werte für den obersten Blattstielabschnitt = 100% gesetzt und die Enzymaktivität der mittleren und unteren Abschnitte darauf bezogen. Die Ergebnisse dieser Berechnungen sind in Abbildung 3.8 dargestellt.

Mit beiden Nachweismethoden wurde übereinstimmend sowohl im nicht parasitierten als auch im parasitierten Blattstiel ein Gradient in der Enzymaktivität entlang des Blattstieles gemessen. Die höchste Aktivität lag in dem Abschnitt oberhalb der Parasitierung vor, die



**Abb. 3.8: Wirt-Parasit-System *Pelargonium-Cuscuta***  
**Vergleich der „in-vivo“ und „in-vitro“ Messungen der zellwandgebundenen sauren Invertaseaktivität in nicht parasitierten und parasitierten Blattstielen von *Pelargonium***

Der Glucoseumsatz des oberen Blattstielabschnittes wurde = 100% gesetzt und die Enzymaktivität des mittleren bzw. unteren Blattstielabschnittes darauf bezogen.

niedrigste Aktivität wurde im Abschnitt unterhalb der Parasitierung gemessen. Bei der in-vivo-Methode ergaben die Berechnungen für nicht parasitierte Blattstiele im mittleren Abschnitt eine Invertaseaktivität von 89,7% und im unteren von 56,8% im Vergleich zum oberen Abschnitt des Blattstieles. Für den parasitierten Blattstiel wurden im mittleren Abschnitt (mit Haustorien) eine Invertaseaktivität von 89,7% und im unteren von 51,5% errechnet. Die Aktivitätsgradienten der Invertase berechnet nach den ermittelten Glucoseumsätzen der in-vitro Methode zeigten einen ähnlichen Abfall in der Enzymaktivität. Der nicht parasitierte Blattstiel wies im mittleren Abschnitt eine Aktivität von 86,4% und im unteren Abschnitt von 54,4% auf, im parasitierten Blattstiel besaß der mittlere Abschnitt (mit Haustorien) 86,7% und der untere Abschnitt 56,5% der Aktivität ihrer jeweiligen oberen Blattstielabschnitte.

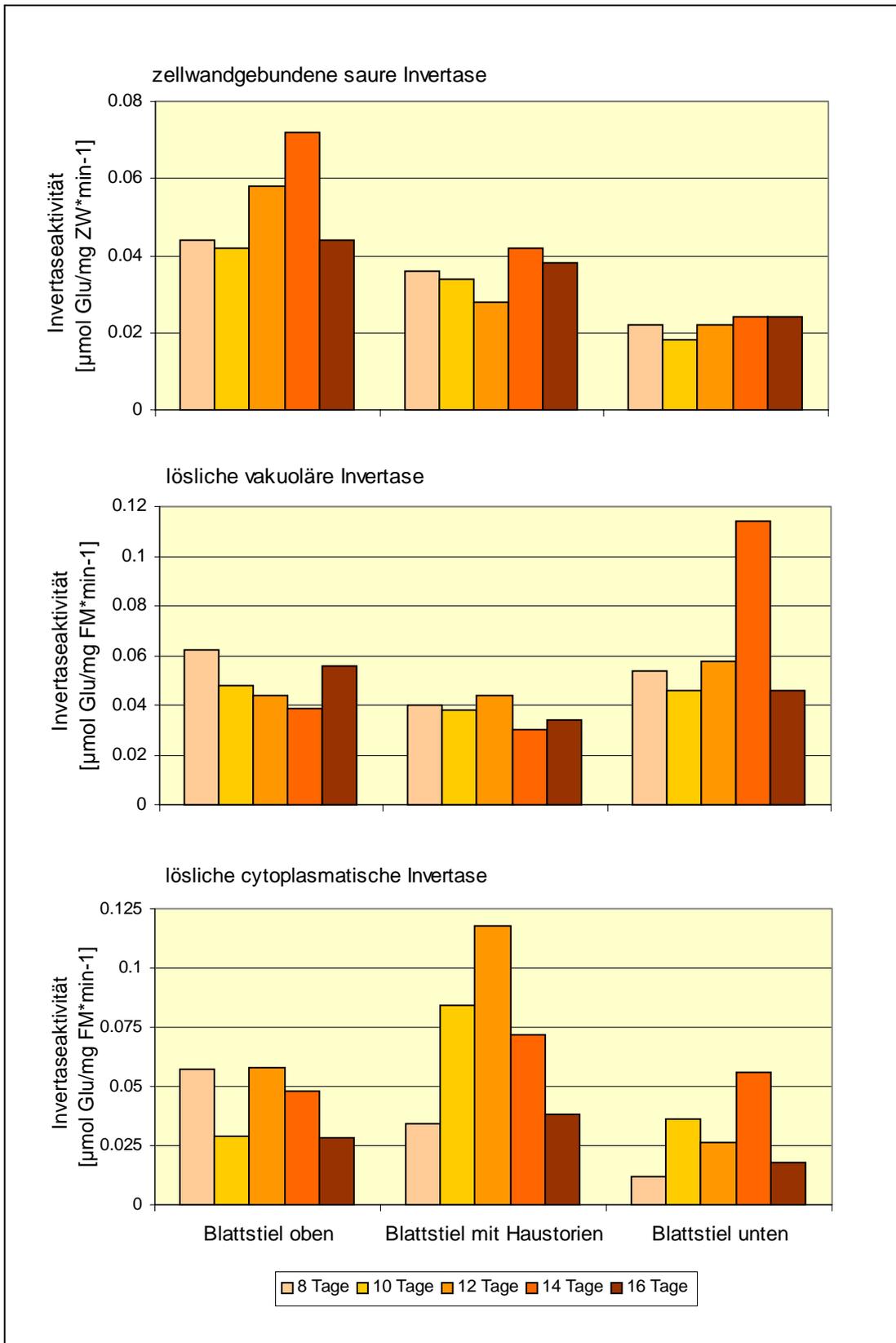
### **3.3.2 Bestimmung der zellwandgebundenen sauren Invertase, der löslichen sauren und löslichen neutralen Invertase im Wirt-Parasit-System *Pelargonium-Cuscuta* während der Ausbildung eines funktionellen Phloemanschlusses**

Ausgehend von den unter 3.1.2 dargestellten Ergebnissen für das 16 Tage alte funktionelle Wirt-Parasit-System wurden Enzymbestimmungen über einen Zeitraum zwischen 8 und 16 Tagen nach Ansetzen des Parasiten durchgeführt. Dabei sollten eventuelle Veränderungen in der Enzymaktivität während der Ausbildung des Haustorialkontaktes erfaßt werden. Neben der zellwandgebundenen sauren Invertase wurden auch die lösliche saure und die lösliche cytoplasmatische Invertase bestimmt. Wie in den vorstehenden Versuchen wurden die Blattstiele im parallelen Induktionsmodus infiziert. Die Ergebnisse der Enzymbestimmungen sind in den Abbildungen 3.9 und 3.10 zusammengefaßt.

Im Verlauf der Ausbildung des Leitbündelkontaktes zwischen Wirt und Parasit war im parasitierten Blattstiel keine signifikante Erhöhung der Aktivität der zellwandgebundenen sauren Invertase festzustellen. Er wies als Maß der Enzymaktivität einen Saccharoseumsatz zwischen 30 und 40nmol Glucose/ mg ZW\*min auf und unterschied sich damit nicht von der Enzymaktivität des mittleren Abschnitts (39nmol Glucose/ mg ZW\*min) eines nicht parasitierten Blattstieles. Der Blattstiel oberhalb der Haustorien besaß während des gesamten untersuchten Zeitraumes die höchste Invertaseaktivität.

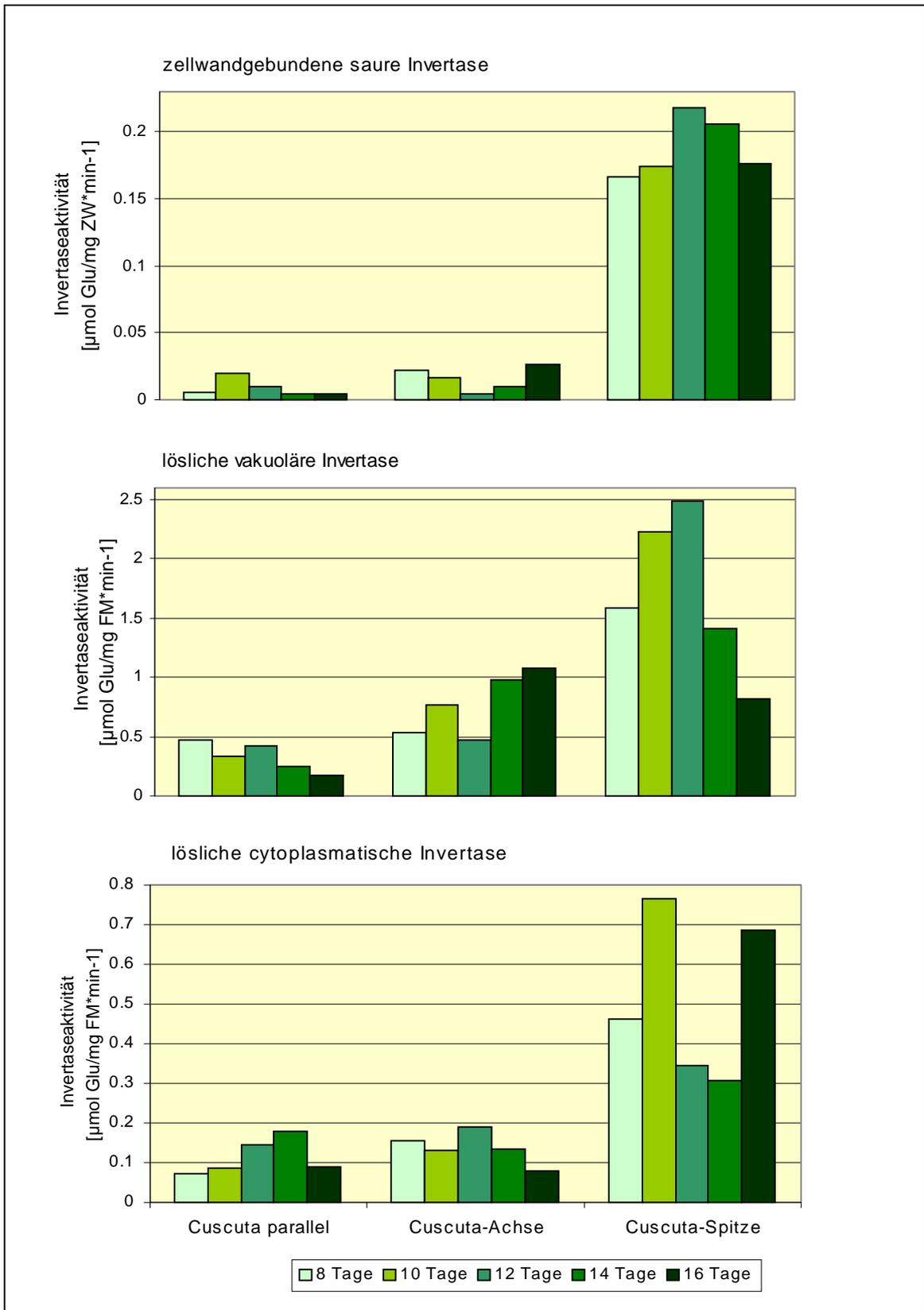
Die Bestimmung der Enzymaktivität der löslichen sauren Invertase zeigte ein der zellwandgebundenen sauren Invertase vergleichbares Bild. Im parasitierten Blattstielabschnitt waren während des untersuchten Zeitraumes keine signifikanten Veränderungen in der Enzymaktivität zu beobachten.

Bei der Aktivitätsmessung der neutralen Invertase ergaben sich für die Abschnitte des Blattstieles einige Abweichungen vom bisherigen Muster. Nach 8tägiger Parasitierung betrug die Enzymaktivität im parasitierten Blattstiel 0,034µmol Glu/mg FM\*min. Zwei Tage später war sie auf mehr als das Doppelte (0,084µmol Glu/mg FM\*min) angestiegen. Beim nächsten Meßpunkt, nach 12 Tagen wurde nochmals eine Erhöhung gemessen (0,118µmol Glu/mg FM\*min). Im Verlauf der folgenden 4 Tage nahm der Wert wieder ab und erreichte das Niveau der 8tägigen Parasitierung (0,038µmol Glu/mg FM\*min). Die Enzymaktivität der „parallelen“ *Cuscuta*-Achse lag stets über der des parasitierten Blattstieles.



**Abb. 3.9: Wirt-Parasit-System *Pelargonium-Cuscuta***  
**Bestimmung der Invertaseaktivitäten während der Ausbildung des Haustorial-**  
**kontaktes in definierten Abschnitten des Blattstiel des Wirtes**

Ansetzen des Parasiten an den Wirt = Tag 0; Mischproben von je 4 W-P-S.



**Abb. 3.10: Wirt-Parasit-System *Pelargonium-Cuscuta***  
**Bestimmung der Invertaseaktivitäten während der Ausbildung des Haustorial-**  
**kontaktes in definierten Abschnitten des Parasiten**

Ansetzen des Parasiten an den Wirt = Tag 0; Mischproben von je 4 W-P-S.

Im Spitzenbereich des Parasiten wurden während des gesamten Versuchszeitraumes mit  $0,166 - 0,218 \mu\text{mol Glu/mg ZW} \cdot \text{min}$  die höchsten Werte für die zellwandgebundene saure Invertase gemessen. Die Aktivität in dem haustorienbildenden Achsenabschnitt (*Cuscuta* parallel) war stets geringer als in dem benachbarten Blattstielabschnitt mit Haustorien.

Die lösliche saure Invertase zeigte gegenüber der zellwandgebundenen sauren Invertase in allen Abschnitten des Parasiten eine annähernd zehnfach höhere Enzymaktivität. In der parallelen Achse wurden zwischen  $0,466 \mu\text{mol Glu/mg FM} \cdot \text{min}$  am 8. Tag und  $0,174 \mu\text{mol Glu/mg FM} \cdot \text{min}$  am 16. Tag gemessen. Innerhalb von 8 Tagen sank die Enzymaktivität der löslichen sauren Invertase in dem haustorienbildenden Achsenabschnitt auf ein Drittel. Die Enzymaktivität in der freien Achse hingegen stieg von  $0,530 \mu\text{mol Glu/mg FM} \cdot \text{min}$  nach 8 Tagen Infektion auf  $1,082 \mu\text{mol Glu/mg FM} \cdot \text{min}$  nach 16tägiger Infektion. Die höchsten Werte wurden wie auch bei der zellwandgebundenen sauren Invertase in der *Cuscuta*-Spitze gemessen (siehe Tabelle 4.4).

Die lösliche cytoplasmatische Invertase wies ein von den beiden sauren Invertasen abweichendes Aktivitätsprofil auf. Die Enzymaktivität in dem haustorienbildenden Achsenabschnitt lag stets über der des Blattstielabschnittes mit Haustorien (Blattstiel mit Haustorien  $0,034 - 0,118 \mu\text{mol Glu/mg FM} \cdot \text{min}$ ; *Cuscuta* parallel  $0,074 - 0,180 \mu\text{mol Glu/mg FM} \cdot \text{min}$ ). Zwischen der parallelen und der freien Achse bestanden keine deutlichen Unterschiede in der Aktivität der löslichen neutralen Invertase. Übereinstimmend mit den beiden anderen Enzymen, wies auch hier die Spitze des Parasiten die höchste Aktivität auf ( $0,346 - 0,764 \mu\text{mol Glu/mg FM} \cdot \text{min}$ ).

### **3.3.3 Bestimmung der Aktivität von Saccharosesynthase und ADP-Glucose-Pyrophosphorylase in der *Cuscuta*-Achse**

Für die Bestimmung der Enzymaktivitäten der Saccharosesynthase (Susy; nach WEBER et al., 1996 a) und der ADP-Glucose-Pyrophosphorylase (AGPase; nach WEBER et al., 1995 a) innerhalb der Parasitenachse wurden von der Stammkultur je zehn *Cuscuta*-Achsen (Länge der bearbeiteten freien Achse  $\approx 30\text{cm}$ ) geerntet, die 16 Tage parallel an Blattstielen parasitierten. Die Achsen wurden zu Mischproben vereint. Die Ergebnisse der Enzymbestimmung wurden in Tabelle 3.6 zusammengefaßt.

Bei beiden Enzymen wies der haustorientragende Bereich der *Cuscuta*-Achse (parallel zum Blattstiel des Wirtes) gegenüber der freien *Cuscuta*-Achse eine geringere Aktivität auf. Für AGPase konnte ein Gradient in der Aktivität entlang der *Cuscuta*-Achse mit dem höchsten Wert im Spitzenbereich festgestellt werden. Die Saccharosesynthase zeigte in der *Cuscuta*-Spitze und in der freien Achse übereinstimmende Werte in der Aktivität.

**Tab. 3.6: *Cuscuta reflexa***

**Enzymaktivität von Saccharosesynthase (Susy) und ADP-Glucose-Pyrophosphorylase (AGPase) in definierten Abschnitten der *Cuscuta*-Achse.**

Bestimmung der Enzymaktivitäten in der cytosolischen Fraktion definierter Abschnitte. Der Substratumsatz von Glucose (Susy) bzw. NADH (AGPase) wurde mittels enzymatischer Tests bestimmt. Mischprobe aus je 10 Achsen.

Abschnitt	Enzymaktivität	
	Susy [ $\mu\text{mol Glu/ g FM}\cdot\text{min}^{-1}$ ]	AGPase [ $\mu\text{mol NADH/ g FM}\cdot\text{min}^{-1}$ ]
<i>Cuscuta</i> parallel	1,9	0,02
<i>Cuscuta</i> freie Achse	8,9	0,08
<i>Cuscuta</i> Spitze	8,9	0,15

### **3.4 Untersuchungen zur Selektivität des Übertritts von Substanzen aus dem Phloem des Wirtes in den Parasiten**

Um zu überprüfen, ob der Parasit in der Lage ist, aus den im Phloem des Wirtes transportierten Substanzen auszuwählen, wurde ein breites Spektrum an phloemmobilen, biotischen (Saccharose, Aminosäuren, Phytohormone) und xenobiotischen (nichtproteinogene Aminosäure, Wirkstoffe von Pflanzenschutzmitteln) Verbindungen an den Wirt appliziert.

Aufgrund ihrer unterschiedlichen chemischen Struktur bestehen zwischen den eingesetzten Substanzen große Unterschiede in der Lipophilie und damit auch in der Geschwindigkeit ihrer Aufnahme über die Kutikula. Um diese Barriere zu umgehen und gleichzeitig standardisierte Bedingungen zu schaffen, wurden die Verbindungen, wie von GRIMM et al. (1995) eingeführt und erfolgreich bei Translokationsuntersuchungen benutzt, direkt in das Parenchym des Blattstieles oder des Blattgrundes isolierter Blätter von *Pelargonium zonale* injiziert.

Nach Injektion von  $^{14}\text{C}$ -Saccharose an nicht parasitierte Blattstiele fand sowohl ein basipetaler Transport in die unterhalb der Injektionsstelle liegenden Abschnitte als auch ein akropetaler Transport in die Blattspreite statt (siehe Tabelle 3.7). Nach dreistündiger Translokationszeit befanden sich noch  $36,7 \pm 3,0\%$  der radioaktiv markierten Verbindungen an der Injektionsstelle,  $60,5 \pm 3,1\%$  in der Blattspreite und nur  $2,7 \pm 0,6\%$  in den basalen Abschnitten. Durch die Parasitierung mit *Cuscuta* im mittleren Blattstielbereich, ungefähr 3,5cm von der Injektionsstelle entfernt, erhöhte sich die Translokationsrate von 63,3% auf 75,8%, gleichzeitig nahm der Transport in basipetaler Richtung, wo sich auch der Parasit befand, zu. Unter diesen Bedingungen wurden in der Blattspreite nur noch  $15,7 \pm 3,7\%$ , in den basalen Abschnitten, einschließlich des

Parasiten, aber über 60% gemessen. Setzt man den Wert für die basipetal transportierten Verbindungen = 100%, dann entfallen auf den Parasiten davon 67%.

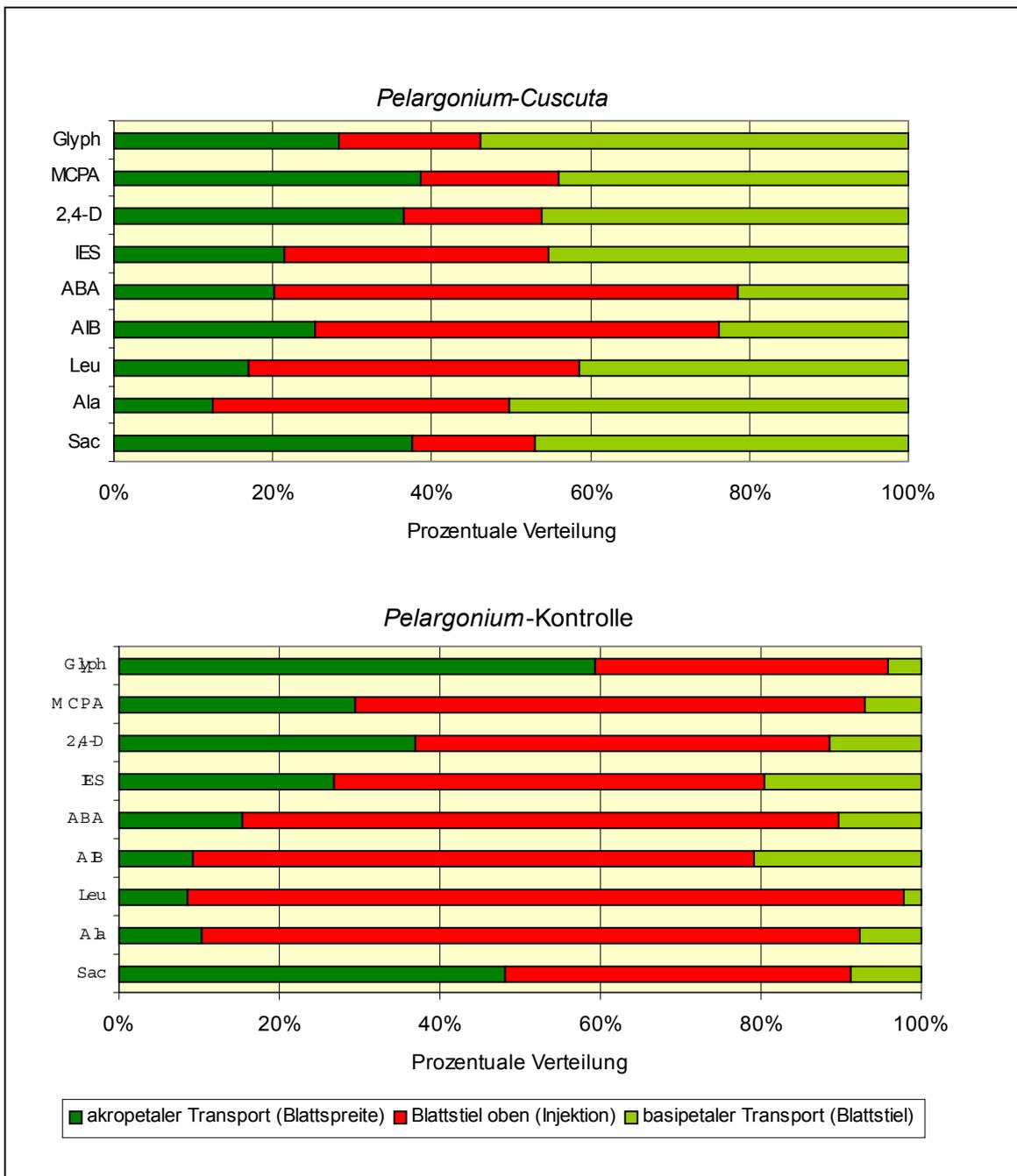
**Tab. 3.7: Wirt-Parasit-System *Pelargonium-Cuscuta***  
**Translokationsraten und Verteilungsmuster der <sup>14</sup>C-Verbindungen nach Injektion von <sup>14</sup>C-Saccharose in parasitierten und nicht parasitierten Blättern von *Pelargonium zonale***

Die Injektion erfolgte in den oberen Abschnitt des Blattstieles; nach einer Translokationszeit von 3 Stunden wurde die Radioaktivität der methanollöslichen Fraktion der einzelnen Pflanzenabschnitte bestimmt. n = 10. Mittelwerte ± SF 95% Konfidenzgrenzen.

Abschnitt	Prozentualer Anteil an radioaktiv markierten Verbindungen bezogen auf			
	aufgenommene <sup>14</sup> C-Verbindungen (%)		basipetal austransportierte <sup>14</sup> C-Verbindungen (%)	
	- Parasit	+ Parasit	- Parasit	+ Parasit
Blattspreite	60,5 ± 3,1	15,7 ± 3,7		
Blattstiel oben (Fütterung)	36,7 ± 3,0	24,2 ± 3,8		
Blattstiel ± Haustorien	2,6 ± 0,6	20,5 ± 2,9	94,7 ± 1,5	31,6 ± 3,7
Blattstiel unten	0,1 ± 0,01	0,5 ± 0,3	5,1 ± 0,7	1,2 ± 0,6
<i>Cuscuta</i> gewunden		11,1 ± 3,6		19,2 ± 6,4
<i>Cuscuta</i> freie Achse		18,1 ± 5,3		31,3 ± 4,7
<i>Cuscuta</i> Spitze		9,7 ± 3,5		16,5 ± 4,9
<i>Cuscuta</i> gesamt		38,9 ± 2,6		67,0 ± 3,9
Puffer	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,1
Translokationsrate	63,3	75,8	63,3	75,8

So wie Saccharose verhielten sich auch Leucin, Alanin, die Phytohormone Indolylessigsäure (IES) und Abscisinsäure (ABA) sowie die Xenobiotika 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D), Methylchlorphenoxyessigsäure (MCPA) und Glyphosat: Durch die Parasitierung mit *Cuscuta* erhöhten sich die Translokationsrate und der Transport in die unterhalb der Injektionsstelle gelegenen Gewebe. Lediglich bei  $\alpha$ -Aminoisobuttersäure ( $\alpha$ -AIB) überwog auch schon in den nicht parasitierten Blattstielen der Transport in basipetaler Richtung, durch die Parasitierung wurde dieser Wert wie bei den anderen Verbindungen erhöht (Abb. 3.11).

*Cuscuta* stellte stets den Hauptsink im Wirt-Parasit-System dar.

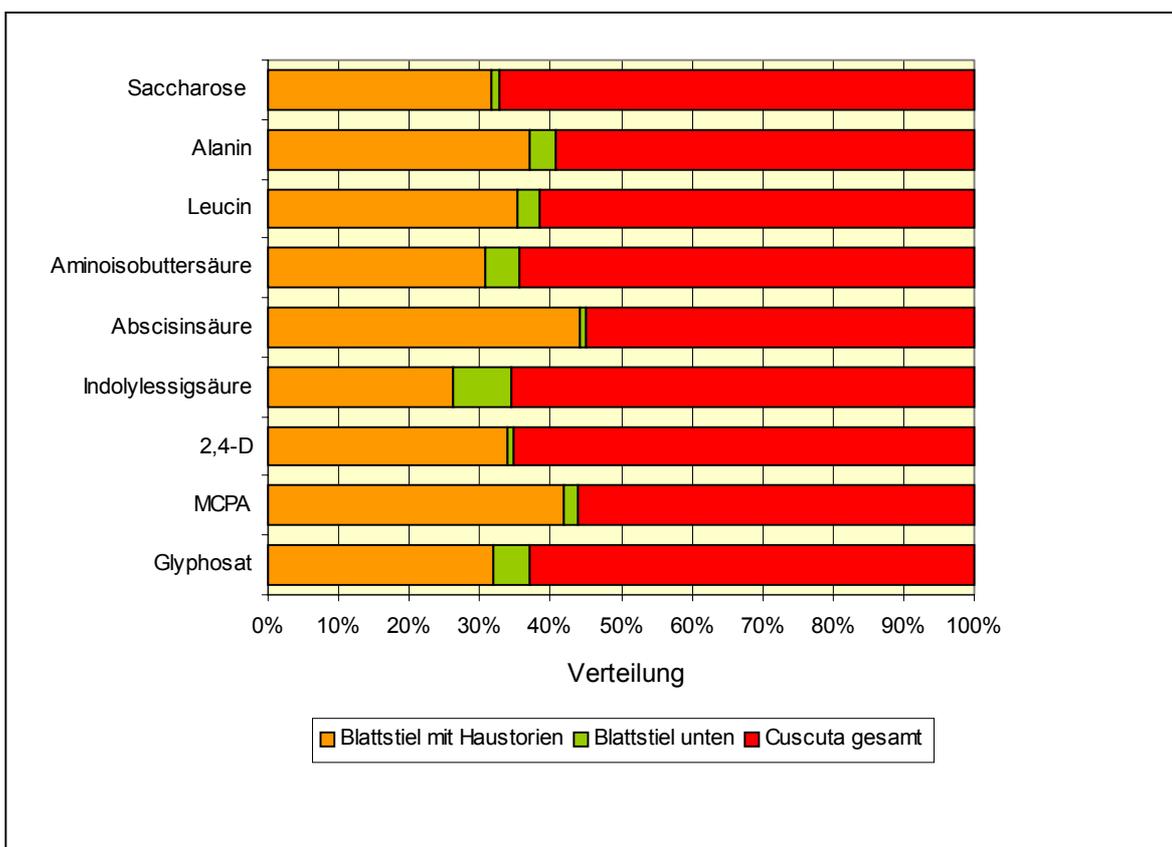


**Abb. 3.11: Wirt-Parasit-System *Pelargonium-Cuscuta* und *Pelargonium zonale* Verteilung der radioaktiv markierten Verbindungen nach Injektion in den oberen Blattstielabschnitt.**

Die Injektion der Substanzen erfolgte in gepuffertem Medium (10mM MES, pH 5,0). Die Translokationszeit betrug 3 Stunden. Bestimmung des Radioaktivitätsgehaltes der methanollöslichen Fraktion. Unter „akropetalem Transport“ wurde der Transport aus der Fütterungsstelle in Richtung Blattspreite, unter „basipetaler Transport“, der Transport in den unteren und mittleren Blattstiel  $\pm$  *Cuscuta* verstanden. n = 10.

Glyph – Glyphosat, MCPA – Methylchlorphenoxyessigsäure, 2,4-D – 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure, IES – Indolylessigsäure, ABA – Abscisinsäure, AIB –  $\alpha$ -Aminoisobuttersäure, Leu – Leucin, Ala – Alanin, Sac – Saccharose.

Vergleicht man die prozentuale Verteilung der einzelnen Substanzen in den basipetal vom Injektionsort liegenden Abschnitten, so fällt auf, daß unabhängig von ihrer chemischen Struktur und physiologischen Wirkung nach dreistündiger Translokationszeit immer zwischen 55 und 65% im Parasiten vorlagen. Dieses Ergebnis läßt auf einen unspezifischen Transfer der Verbindungen zwischen dem Phloem des Wirtes und dem Parasiten schließen. Während Saccharose als Haupttransportzucker im Wirt und Parasit (Haupt, 1994), die untersuchten Aminosäuren, mit Ausnahme von  $\alpha$ -Aminoisobuttersäure, sowie die Phytohormone zu den „biotischen“ im Phloem transportierten Substanzen zählen, handelt es sich bei den Xenobiotika MCPA, 2,4-D und Glyphosat um pflanzenfremde, den Stoffwechsel beeinträchtigende Substanzen. Die Ergebnisse dieser Versuche wurden in Abbildung 3.12 zusammengefaßt. Die ausführlichen Daten befinden sich im Tabellenanhang (Tab. 4.5).



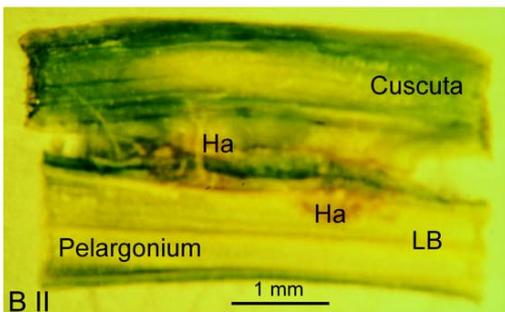
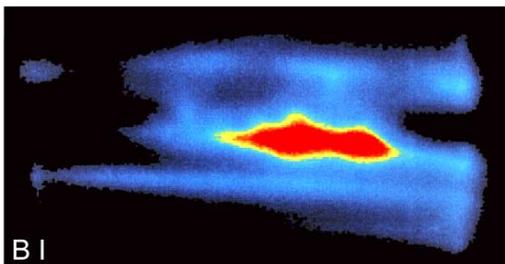
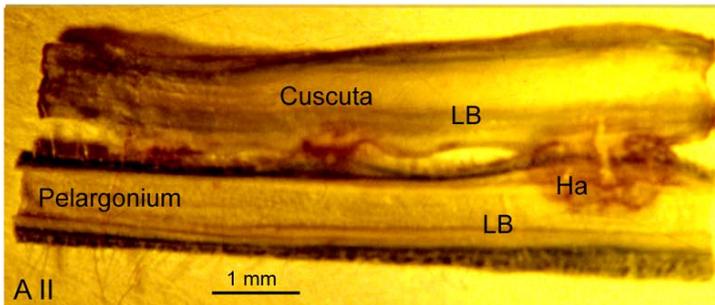
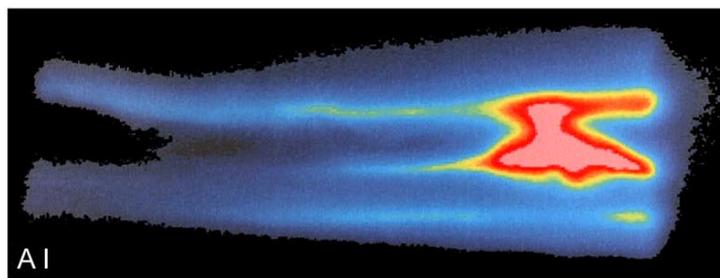
**Abb. 3.12: Wirt-Parasit-System *Pelargonium zonale-Cuscuta reflexa***  
**Verteilungsmuster der basipetal transportierten Verbindungen nach Injektion in den oberen Blattstielabschnitt.**

Methanolextraktion ohne Fraktionierung. Die Radioaktivität der basipetal transportierten Verbindungen wurde = 100% gesetzt und die Anteile der einzelnen definierten Abschnitte errechnet. Translokationszeit 3 Stunden. n = 10.

Auch der Übertritt der nicht proteinogenen  $\alpha$ -Aminoisobuttersäure und des Xenobiotikums MCPA zwischen Wirt und Parasit erfolgte wie die der Assimilate lokal sehr begrenzt an der Kontaktstelle der Haustorien. Abbildung 3.13 zeigt die mit dem Phosphorimager aufgenommenen Radioaktivitätsverteilungen im parasitierten Abschnitt des Blattstieles nach Applikation von  $^{14}\text{C}$ -AIB und  $^{14}\text{C}$ -MCPA an die Blattspreite der *Pelargonium*-Blätter. Zur Herstellung der Präparate wurden aus den Blattstielabschnitten mit den Haustorien drei Stunden nach Applikation der Verbindungen mit der Rasierklinge Längsschnitte angefertigt, eingefroren und zwischen Glasscheiben gefriergetrocknet. Anschließend wurden die Schnitte an einen Screen exponiert. Die unterschiedliche Konzentration der radioaktiv markierten Verbindungen in den Geweben der Kontaktzone zwischen Wirt und Parasit wurden nach Auswertung mit dem Phosphorimager als Fehlfarbenbild in Abbildung 3.13 dargestellt.

Die Radioaktivitätsverteilung nach Applikation von  $^{14}\text{C}$ -AIB bzw.  $^{14}\text{C}$ -MCPA ähnelt sehr dem Ergebnis des analog durchgeführten Experimentes mit  $^{14}\text{C}$ -Saccharose (siehe Abbildung 3.4). Die Orte der höchsten Konzentration radioaktiv markierter Verbindungen stellen die im Wirtsgewebe befindlichen Haustorien dar. Die Leitbündel beider Pflanzen (Wirt und Parasit) heben sich vom umgebenden parenchymatischen Gewebe durch eine höhere Konzentrationen radioaktiven Verbindungen ab, weisen jedoch eine geringere Konzentration auf als die Haustorien.

Leider konnte auf Grund der Auflösungsgrenze nicht gesehen werden, welchen Weg die Substanzen auf zellulärer Ebene beim Übertritt vom Wirt in den Parasiten nehmen.



A - Applikation von  $^{14}\text{C}$ -MCPA an die Spreite des Wirtes; I - Imagerbild; II - gefriergetrockneter Freihandschnitt

B - Applikation von  $^{14}\text{C}$ -AIB an die Spreite des Wirtes; I - Imagerbild; II - gefriergetrockneter Freihandschnitt

Ha - Haustorium  
LB - Leitbündel

Konzentration radioaktiv markierter Verbindungen



**Abb. 3.13: Wirt-Parasit-System *Pelargonium-Cuscuta***

Lokalisation der  $^{14}\text{C}$ -Verbindungen in der Kontaktzone zwischen Wirt und Parasit nach Applikation von  $^{14}\text{C}$ -MCPA (A I und A II) und  $^{14}\text{C}$ -AIB (B I und B II) an die Spreite des Wirtes. Parasitierung mit *Cuscuta* im mittleren Bereich des Blattstieles (parallele Induktion), Nachweis der Radioaktivität mit dem Phosphorimager.

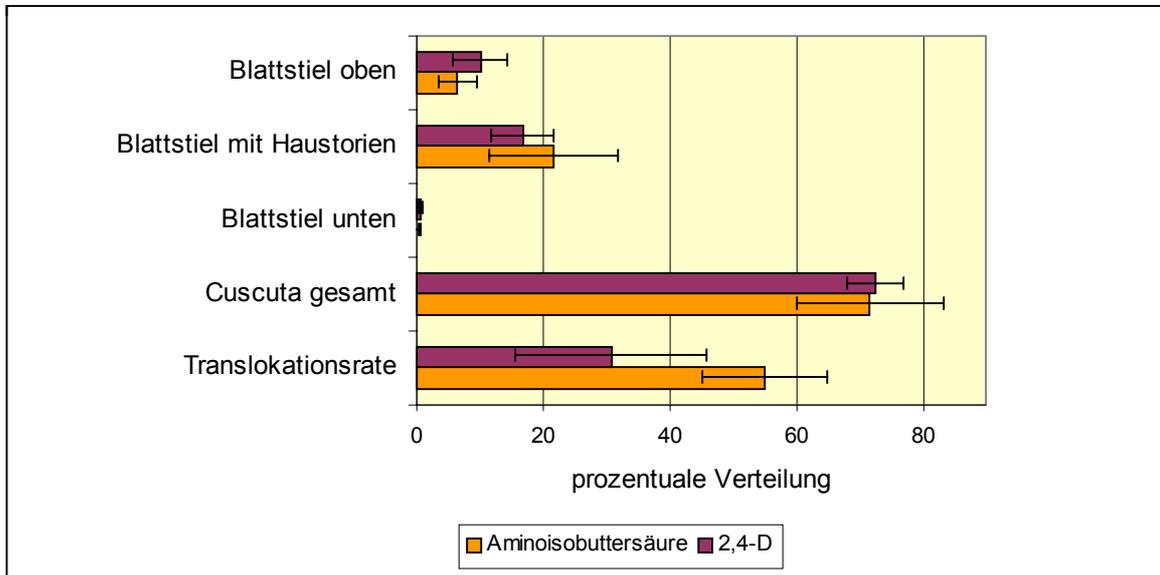
Um den Umfang des Transfers von Assimilaten und den in den vorstehenden Experimenten untersuchten Verbindungen in der *gleichen* Pflanze und unter *gleichen* Bedingungen zu ermitteln, wurden in einer zweiten Versuchsreihe die  $^{14}\text{C}$ -markierten Verbindungen simultan mit  $^3\text{H}$ -markierter Saccharose injiziert. Damit ergab sich auch zusätzlich die Möglichkeit, eine eventuelle Beeinflussung des Phloemstromes, besonders durch die Phytohormone und die Xenobiotika, zu erfassen. Tabelle 3.8 zeigt die Ergebnisse dieser Untersuchungen. Für alle untersuchten Substanzpaare wurden bei einer Translokationszeit von drei Stunden stets übereinstimmende Anteile an  $^3\text{H}$ -Saccharose und der simultan applizierten  $^{14}\text{C}$ -Verbindung im Parasiten gemessen.

**Tab. 3.8: Wirt-Parasit-System *Pelargonium zonale-Cuscuta reflexa*  
Prozentualer Anteil der im Parasiten gemessenen radioaktiv markierten Substanzen bei simultaner Injektion mit radioaktiv markierter Saccharose**

Die Injektion erfolgte in den oberen Abschnitt des Wirtsblattstieles. Translokationszeit 3 Stunden. Methanolextraktion ohne Fraktionierung; glyphosathaltige Proben wurden in 70%igem Methanol extrahiert. n = 10.

In den Parasiten transportierter prozentualer Anteil		
Bezeichnung	Substanz [%]	Saccharose [%]
Saccharose	-----	<b>66,9 ± 3,1</b>
<b>Aminosäuren</b>		
Alanin	<b>68,9 ± 4,7</b>	<b>74,8 ± 3,9</b>
Leucin	<b>62,4 ± 3,8</b>	<b>64,9 ± 4,0</b>
$\alpha$ -Aminoisobuttersäure	<b>70,2 ± 3,3</b>	<b>73,4 ± 3,1</b>
<b>Pflanzliche Hormone</b>		
Abscisinsäure	<b>65,0 ± 5,2</b>	<b>63,6 ± 3,6</b>
Indolyllessigsäure	<b>71,0 ± 5,5</b>	<b>64,5 ± 3,9</b>
<b>Xenobiotische Wirkstoffe</b>		
2,4-D	<b>60,8 ± 4,4</b>	<b>58,9 ± 7,7</b>
MCPA	<b>58,0 ± 5,7</b>	<b>63,9 ± 5,2</b>
Glyphosat	<b>64,3 ± 4,4</b>	<b>57,1 ± 4,3</b>

Auch bei simultaner Applikation von zwei xenobiotischen Verbindungen,  $^3\text{H}$ -Aminoisobuttersäure und  $^{14}\text{C}$ -2,4-D, lagen nach drei Stunden gleich große Anteile,  $71,4 \pm 11,6$  bzw.  $72,5 \pm 4,5\%$ , im Parasiten vor (siehe Abbildung 3.14).



**Abb. 3.14: Wirt-Parasit-System *Pelargonium zonale*-*Cuscuta reflexa***  
**Verteilung der aus der Blattspreite des Wirtes austransportierten radioaktiv markierten Verbindungen in den einzelnen Abschnitten des W-P-S nach simultaner Injektion von  $^3\text{H}$ -Aminoisobuttersäure und  $^{14}\text{C}$ -2,4-D.**

Die Injektion erfolgte in die Blattadern nahe des Blattgrundes. Translokationszeit 3 Stunden. Methanolextraktion ohne Fraktionierung.  $n = 10$ . Mittelwerte  $\pm$  SF 95 % Konfidenzgrenzen.

Diese Ergebnisse sind mit einem apoplastischen Übergang mit zwei Membranpassagen zwischen Wirt und Parasit nur schwer vereinbar. Zumindest für die Aufnahme aus dem Apoplasten in die Absorptionshyphe des Parasiten sind für die einzelnen Verbindungen unterschiedliche Mechanismen mit unterschiedlicher Geschwindigkeit anzunehmen.

Aufnahmeuntersuchungen mit Blattscheiben von *Ricinus communis* bestätigen diese Annahme. Sowohl bei simultaner Applikation von  $^3\text{H}$ -Saccharose und  $^{14}\text{C}$ -Glyphosat als auch von  $^3\text{H}$ -Saccharose und  $^{14}\text{C}$ -MCPA traten durch die unterschiedlich schnelle Aufnahme deutliche Unterschiede im Verhältnis der beiden Substanzen in der Fütterungslösung und im Gewebe auf (siehe Tabelle 3.9). Die Aufnahme des stark hydrophilen und damit nur in geringem Maße membranpermeablen Glyphosats war wesentlich langsamer als die von Saccharose. Das Verhältnis von Saccharose : Glyphosat betrug in der Fütterungslösung 1389 : 1, im Gewebe 4166 : 1. Die lipophilen Xenobiotika 2,4-D und MCPA wurden dagegen schneller als Saccharose aufgenommen. Das Verhältnis von Saccharose : 2,4-D sowie von Saccharose : MCPA im Gewebe war in beiden Fällen gegenüber der Fütterungslösung erniedrigt (Tabelle 3.9).

**Tab. 3.9: *Ricinus communis*****Konzentrationsverhältnisse in der Fütterungslösung und im Gewebe von <sup>14</sup>C-markierten Xenobiotika und <sup>3</sup>H-markierter Saccharose bei simultaner Applikation an ausgestanzte Blattscheiben**

Berechnung der Konzentration der Substanzen im pflanzlichen Gewebe (nmol/g FM) und in der Fütterungslösung (nmol/ml). Extraktion in Methanol ohne Fraktionierung. Inkubationszeit 3 Stunden. n = 10.

Simultan mit Saccharose applizierte Substanz	Verhältnis von Saccharose / Xenobiotikum	
	in der Fütterungslösung	im Gewebe
Glyphosat	1389 : 1	4166 : 1
MCPA	1204 : 1	278 : 1
2,4-D	250 : 1	43 : 1

Berechnet man dagegen aus den Daten der simultanen Injektion von Saccharose mit MCPA, 2,4-D bzw. Glyphosat die Verhältnisse der Substanzpaare im mittleren Wirtsblattstiel und im Parasiten, so konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Im Wirtsblattstiel wurde für Saccharose : Glyphosat ein Verhältnis von 30,9 : 1 ermittelt, in der *Cuscuta* betrug es 28,2 : 1. Bei Applikation von Saccharose und MCPA bzw. Saccharose und 2,4-D lagen im Blattstiel des Wirtes Verhältnisse von 1,2 : 1 bzw. 1,0 : 1 und im Parasiten von 1,5 : 1 bzw. 0,9 : 1 vor (siehe Tabelle 3.10).

In keinem Fall konnten signifikante Unterschiede im Verhältnis zwischen den beiden Substanzen im Wirtsblattstiel und im Parasiten beobachtet werden.

**Tab. 3.10: Wirt-Parasit-System *Pelargonium-Cuscuta*****Verhältnisse zwischen den <sup>14</sup>C-markierten Xenobiotika und <sup>3</sup>H-markierter Saccharose im Wirtsblattstiel und im Parasiten bei simultaner Applikation (Injektion) der Verbindungen in den oberen Abschnitt des Blattstieles**

Methanolextraktion ohne Fraktionierung. Translokationszeit 3 Stunden. n = 10.

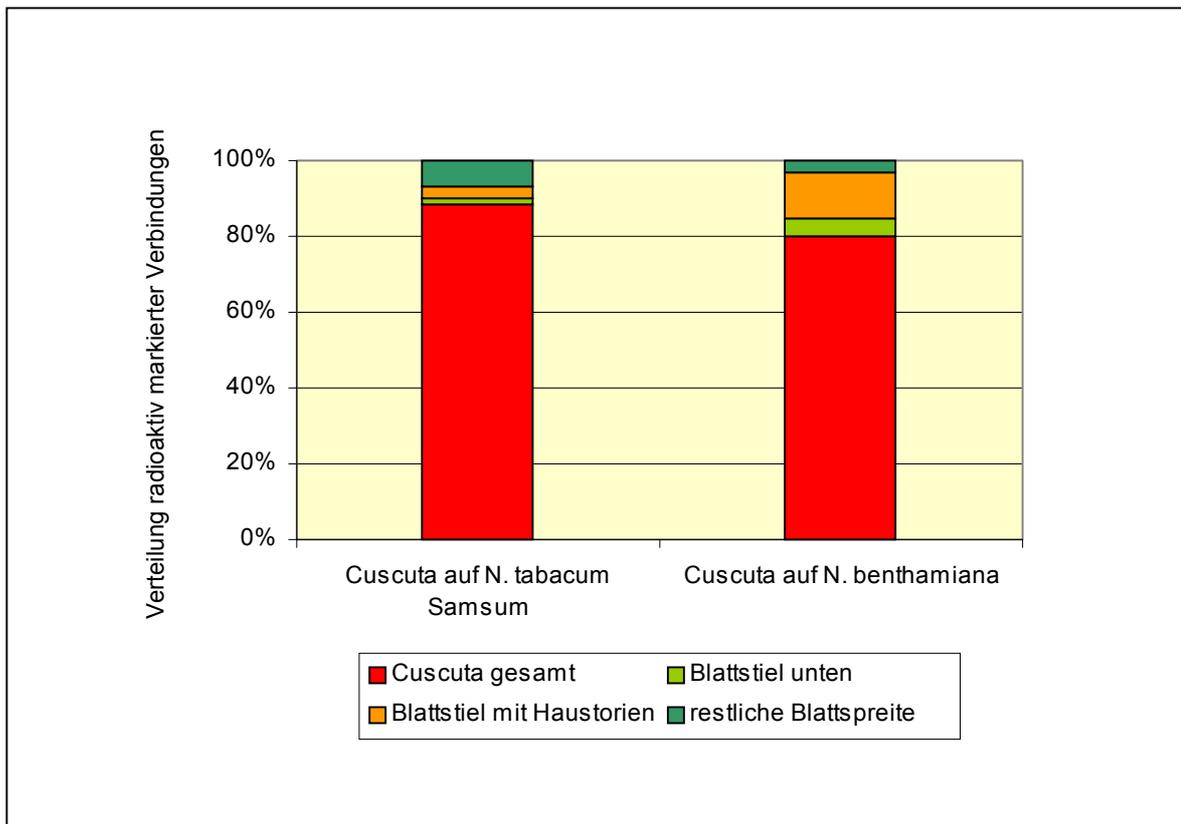
Simultan mit Saccharose applizierte Substanz	Verhältnis von Saccharose / Xenobiotikum	
	Wirtsblattstiel	Parasit
Glyphosat	30,9 : 1	28,2 : 1
MCPA	1,2 : 1	1,5 : 1
2,4-D	1,0 : 1	0,9 : 1

### 3.4 Translokation von Farbstoffen, fluoreszierenden Viren und Proteinen

#### 3.4.1 Nachweis des Phloemanschlusses von *Cuscuta* an *Nicotiana tabacum* cv. Samsun und *Nicotiana benthamiana*

Für die Experimente zur Translokation von Fluoreszenzfarbstoffen und dem Kartoffel Virus X (PVX) wurden *Nicotiana benthamiana*, für die Untersuchung der Translokation von GFP (green fluorescent protein) *Nicotiana tabacum* cv. Samsun als Wirtspflanzen verwendet.

In Vorbereitung der Untersuchungen wurde geprüft, ob *Nicotiana tabacum* und *Nicotiana benthamiana* kompatible Wirte für *Cuscuta reflexa* darstellen und der Parasit in der Lage ist, einen funktionellen Kontakt zum Phloem herzustellen. Dazu wurden die Spreiten von



**Abb. 3.15: Wirt-Parasit-Systeme *Nicotiana tabacum*-*Cuscuta reflexa* und *Nicotiana benthamiana*-*Cuscuta reflexa***  
**Verteilungsmuster der transportierten radioaktiv markierten Verbindungen nach Auftropfen von  $^{14}\text{C}$ -Saccharose auf die Blätter der Wirtspflanze**

$^{14}\text{C}$ -Saccharose wurde auf die mit Sandpapier angeraute Wirtsspreite aufgetropft. Die Fütterungsstelle wurde mehrfach mit MES-Puffer nachgefeuchtet. Nach 12 Stunden wurde der Radioaktivitätsgehalt der methanollöslichen Fraktion der einzelnen Pflanzenabschnitte bestimmt. n = 4.

16 Tage mit *Cuscuta* an den Blattstielen parasitierten Pflanzen mit  $^{14}\text{C}$ -Saccharose betropft und nach 12stündiger Translokationszeit die Verteilungsmuster der radioaktiv markierten Substanzen in den Wirt-Parasit-Systemen bestimmt.

Die Ergebnisse wurden in Abbildung 3.15 dargestellt. Die ausführlichen Daten befinden sich im Tabellenanhang (Tabellen 4.6 und 4.7).

12 Stunden nach Applikation radioaktiv markierter Saccharose an die Blattspreiten des Wirtes wurden in *Cuscuta* 88,2% bzw. 79,8% der austransportierten radioaktiv markierten Verbindungen in *Cuscuta* wiedergefunden. Diese Werte waren vergleichbar mit dem für das Wirt-Parasit-System *Pelargonium-Cuscuta* gefundenen Wert (69,4%).

Damit konnte davon ausgegangen werden, daß sowohl *Nicotiana tabacum* cv. Samsun als auch *Nicotiana benthamiana* kompatible Wirte für *Cuscuta reflexa* darstellen und der Parasit in der Lage ist, innerhalb von 16 Tagen einen funktionellen Kontakt zum Phloem dieser Wirte herzustellen.

### 3.4.2 Untersuchungen zur Translokation phloemmobiler Fluoreszenzfarbstoffe

Die Untersuchung der Translokation phloemmobiler Fluoreszenzfarbstoffe wurde an *Nicotiana benthamiana*-Pflanzen durchgeführt, die an den Blattstielen bzw. an den Sproßachsen mit *Cuscuta reflexa* parasitiert waren. Zwischen dem Auftragungsort, einem unteren source-Blatt, und dem mikroskopisch untersuchten parasitierten Bereich lag eine Translokationsstrecke von ca. 15cm (siehe Abbildung 3.16).

Die Fluoreszenzfarbstoffe Carboxyfluorescein (CF) und 8-Hydroxypyren-1,3,6-Trisulfonsäure (HPTS) wurden als nicht fluoreszierende Ester 5,6-Carboxyfluoreszeindiacetat (CFDA) bzw. 8-Hydroxypyren-1,3,6-Trisulfonsäure-Acetat (HPTSA) über die obere Epidermis der Blätter appliziert. Gelangen CFDA und HPTSA durch Diffusion in die Zellen, werden sie durch unspezifische Esterasen unter Bildung der fluoreszierenden Säuren gespalten. Nach Beladung in das Phloem erfolgt ihr Transport gemeinsam mit den Assimilaten durch die Blattstiele (siehe Abb. 3.16 B) und in die Sproßachse zu den sinks. Innerhalb des Wirt-Parasit-Systems stellte *Cuscuta* den Hauptsink dar. Damit wird es möglich, den Weg der Assimilate zwischen Wirt und Parasit in der intakten Pflanze durch den im mikroskopischen Bild erfaßbaren Weg der fluoreszierenden Farbstoffe sichtbar zu machen.

In einigen Experimenten wurde gleichzeitig der Xylemstrom mit Texas Red Dextran 3000 markiert, dazu wurde der parasitierte Wirtssproß abgeschnitten und mit dem unteren Ende für eine halbe Stunde in die Farbstofflösung eingestellt.

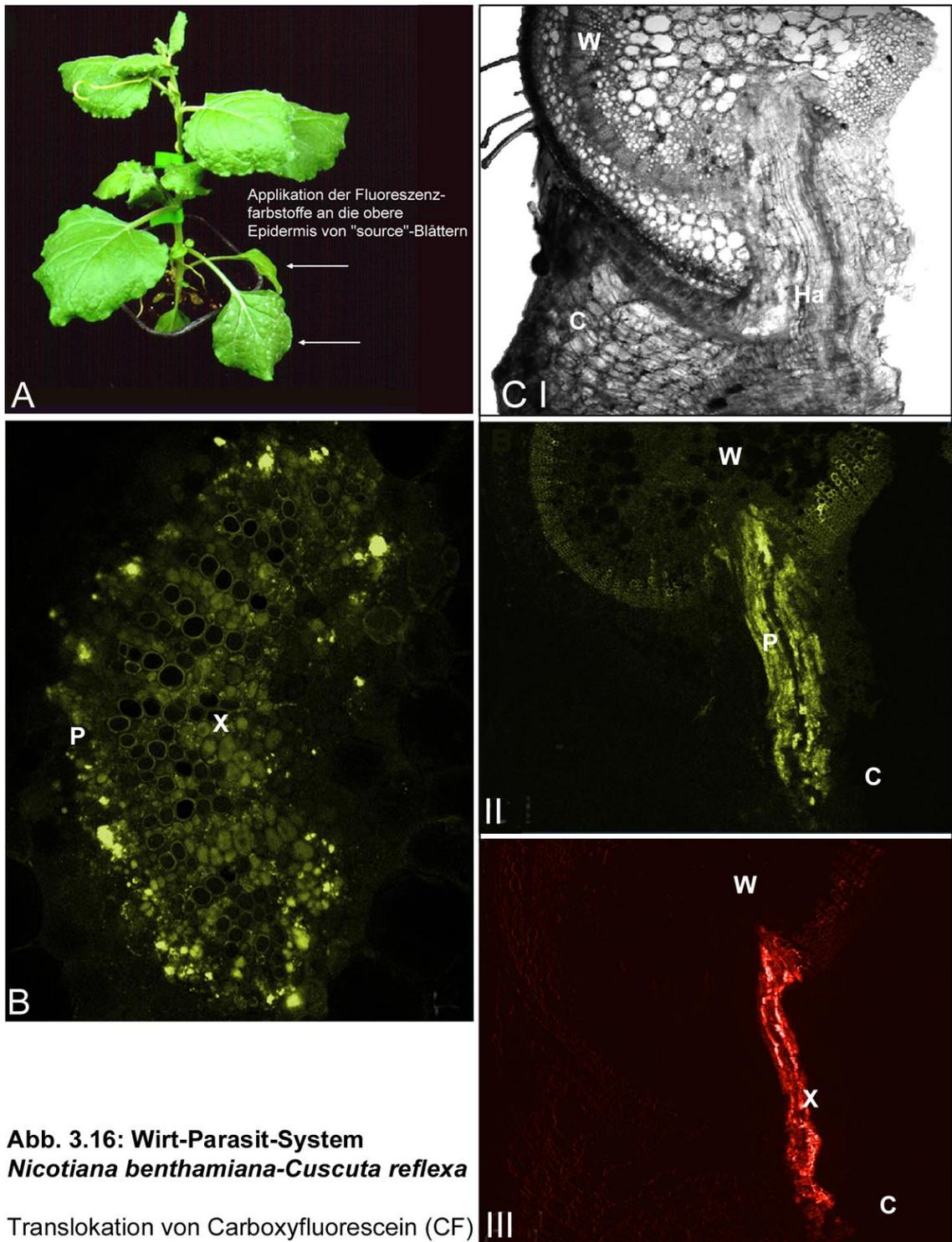
Zwischen dem Anfertigen der Handschnitte und dem Aufnehmen der mikroskopischen

Bilder lag ein maximaler Zeitraum von 20 Minuten, um eine Wiederaufnahme der durch die Verwundung ausgetretenen Farbstoffe und eine damit verbundene unspezifische Markierung des Gewebes zu verhindern. Die Handschnitte wurden auf dem Objektträger in Silikonöl eingebettet. Beispielhafte Aufnahmen von der Translokation der Fluoreszenzfarbstoffe im parasitierten Bereich sind in den Abbildungen 3.16 – 3.18 zusammengestellt.

In Abbildung 3.16, Bild C I ist das Transmissionsbild des Längsschnitts eines Haustoriums von *Cuscuta* gezeigt, das einen Kontakt zum Phloem und Xylem im Sproß des Wirtes hergestellt hat. In Bild C II ist das CF-Fluoreszenzbild dargestellt, in Bild C III das Texas Red-Fluoreszenzbild des gleichen Schnittes. Durch die gleichzeitige Markierung von Phloem mit CF und Xylem mit Texas Red Dextran 3000, kann gezeigt werden, daß zwischen Wirt und Parasit sowohl ein funktioneller Phloem- als auch Xylemkontakt besteht, über den ein Transport vom Wirt in den Parasiten stattfindet. Die Markierung mit dem Fluoreszenzfarbstoff CF (Bild CII) ist ausschließlich auf die Leitgewebe von Wirt und Parasit beschränkt.

Abbildung 3.17 zeigt Längsschnitte durch Haustorien von *Cuscuta*, die in den Sproß von *Nicotiana benthamiana* eingedrungen sind. In Bild A wird eine Kontaktstelle von Wirtssiebröhren mit parasitären Hyphenzellen bei stärkerer Vergrößerung gezeigt. Bild B stellt die Vergrößerung einer direkten Kontaktstelle dar. Es kann festgestellt werden, daß der Farbstoff CF aus den Wirtssiebröhren direkt in die Kontakthyphen des Parasiten übertritt, die sich in unmittelbarer Nachbarschaft der Wirtssiebröhren (Pfeil Abbildung 3.18 A und B) befinden. Die angrenzenden Parenchymzellen erscheinen nicht markiert, so daß ein parenchymatischer Bypaß ausgeschlossen werden kann. Es war auch kein Austritt des Farbstoffes in den Apoplasten zu beobachten. Aus den Leitbündeln des Wirtes, die nicht in direkten Kontakt mit den Hyphenzellen des Parasiten stehen, war kein Austritt von CF in die umgebenden Parenchymzellen zu beobachten.

Die Translokation von HPTS ergab ähnliche Bilder wie die CF-Translokation (Abbildung 3.18). In Bild AI wurde der Querschnitt eines mit *Cuscuta* parasitierten Sprosses von *Nicotiana benthamiana* dargestellt (Transmissionsaufnahme), Bild AII zeigt die Fluoreszenzlichtaufnahme desselben Schnittes. Es ist zu sehen, daß der Fluoreszenzfarbstoff HPTS aus den Siebröhren in das Haustorium des Parasiten übertritt und von dort aus in den Sproß der *Cuscuta* gelangt. Auch in diesem Fall erscheinen nur die Leitbündel beider Pflanzen markiert. HPTS ist auf Grund seiner chemischen Struktur ein ausschließlich symplastisch wandernder Farbstoff, der nicht in der Lage ist, durch die Tonoplastenmembran in die Vakuolen zu permeieren. Neben dem Cytosol erscheint nur noch der Zellkern markiert (Bild B).

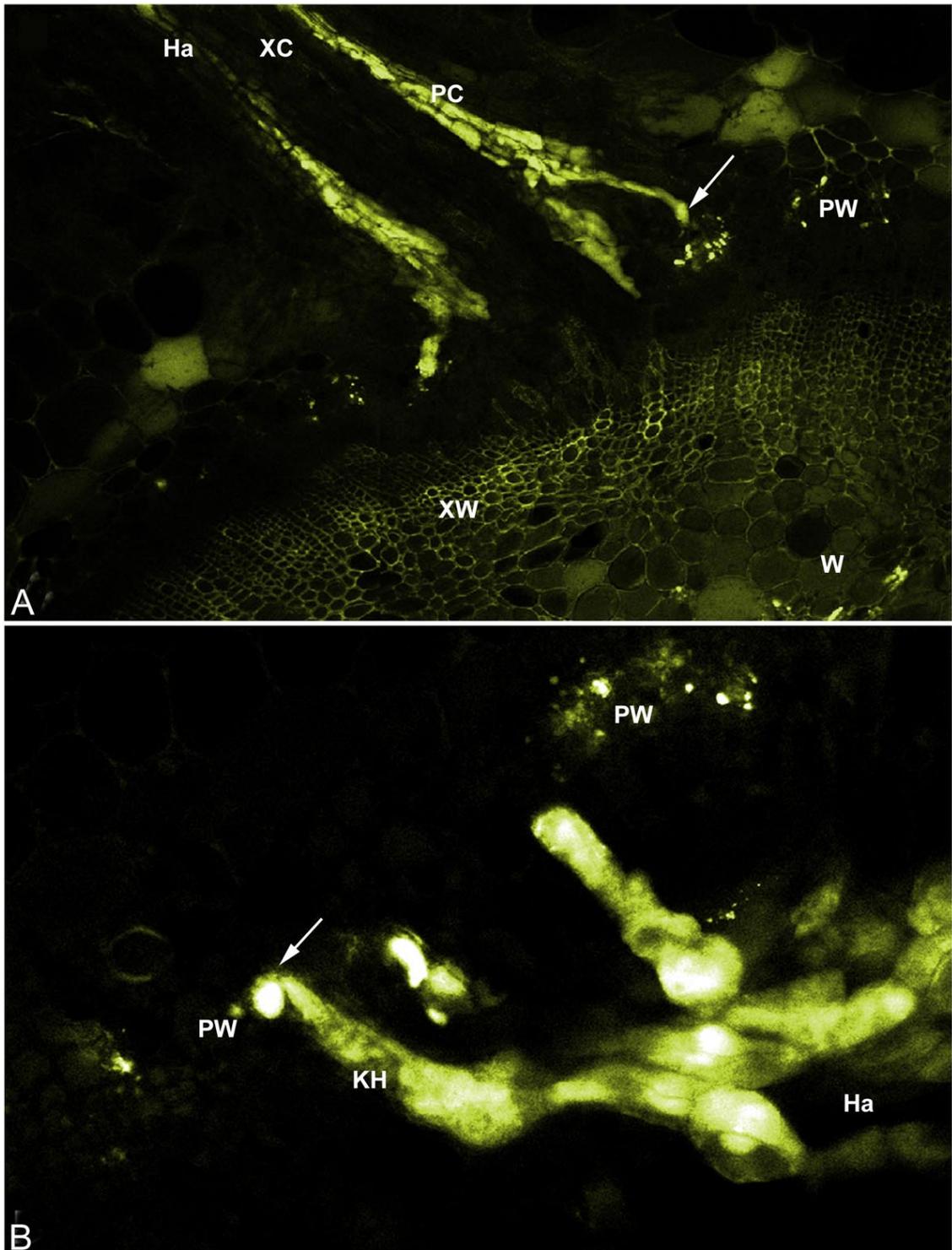


**Abb. 3.16: Wirt-Parasit-System  
*Nicotiana benthamiana*-*Cuscuta reflexa***

Translokation von Carboxyfluorescein (CF)

- (A) - Applikation der Ester der phloemmobilen Farbstoffe erfolgte an die unteren source-Blätter des Wirtes (Pfeil).
- (B) - Translokation von CF entlang des path. Querschnitt durch einen Blattstiel von *Nicotiana benthamiana*. Vergrößerung 1:100.
- (C) - Translokation der Fluoreszenzfarbstoffe CF und Texas Red Dextran 3000 in ein Haustorium von *Cuscuta*. Querschnitt durch einen parasitierten Spross des Wirtes. I - Transmissionsaufnahme, II - Translokation von CF, III - Translokation von Texas Red Dextran 3000. Vergrößerung 1:40.

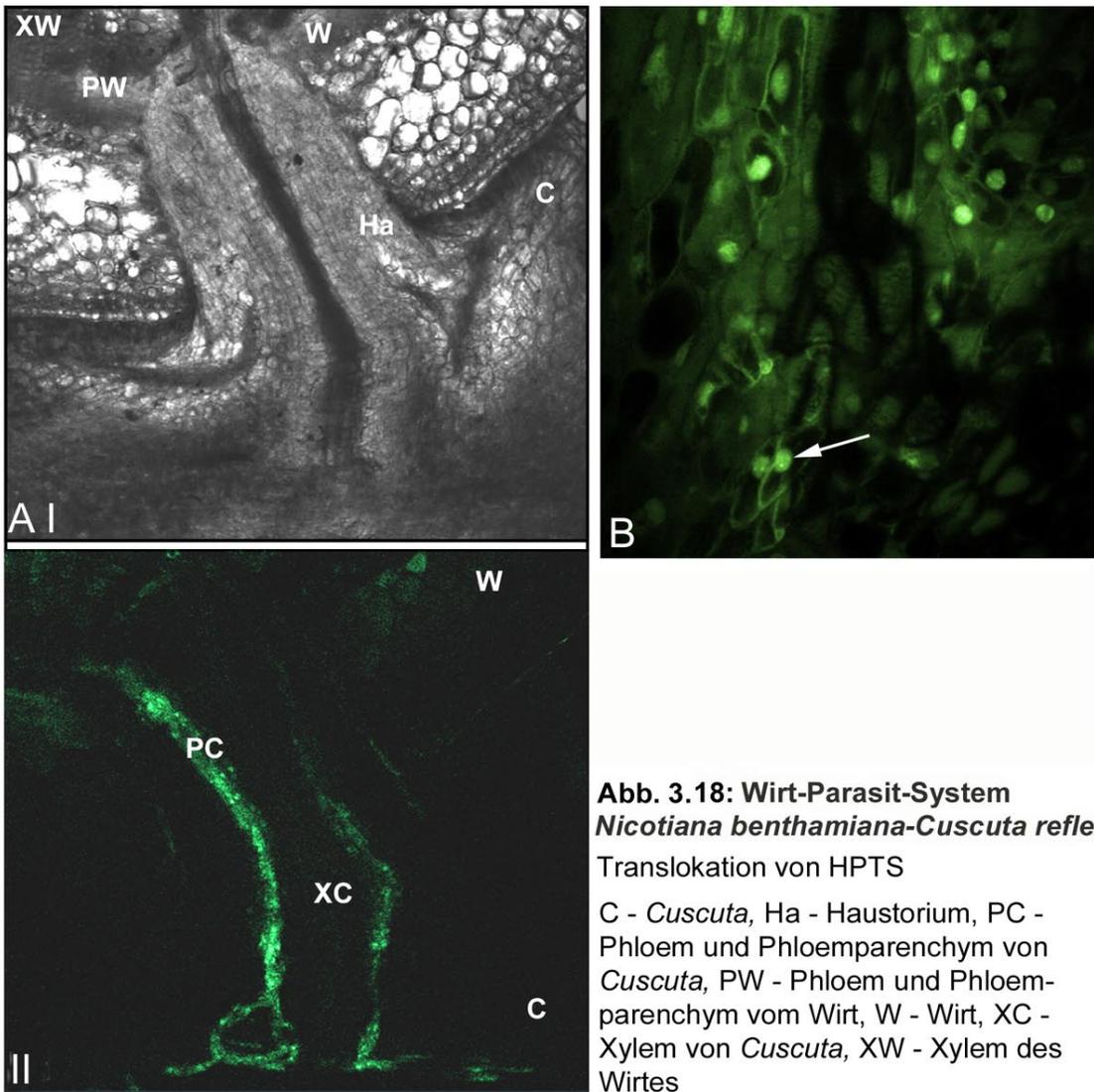
C - *Cuscuta*, Ha - Haustorium, P - Phloem und Phloemparenchym, W - Wirt, X - Xylem und Xylemparenchym



**Abb. 3.17: Wirt-Parasit-System *Nicotiana benthamiana*-*Cuscuta reflexa***  
Translokation von Carboxyfluoreszein (CF)

- (A) - Translokation von CF. Längsschnitt durch ein Haustorium im Spross von *Nicotiana benthamiana*. Vergrößerung 1:100.  
 (B) - Translokation von CF. Schnitt durch die Kontaktstelle von Wirtssiebröhre und *Cuscuta*-Hyphe (Pfeil) einer am Spross des Wirtes parasitierenden *Cuscuta*. Vergrößerung 1:600.

Ha - Haustorium, KH - Kontakthyphe, PC - Phloem von *Cuscuta*, PW - Phloem des Wirtes, W - Wirt, XC - Xylem von *Cuscuta*, XW - Xylem des Wirtes



**Abb. 3.18: Wirt-Parasit-System  
*Nicotiana benthamiana-Cuscuta reflexa***

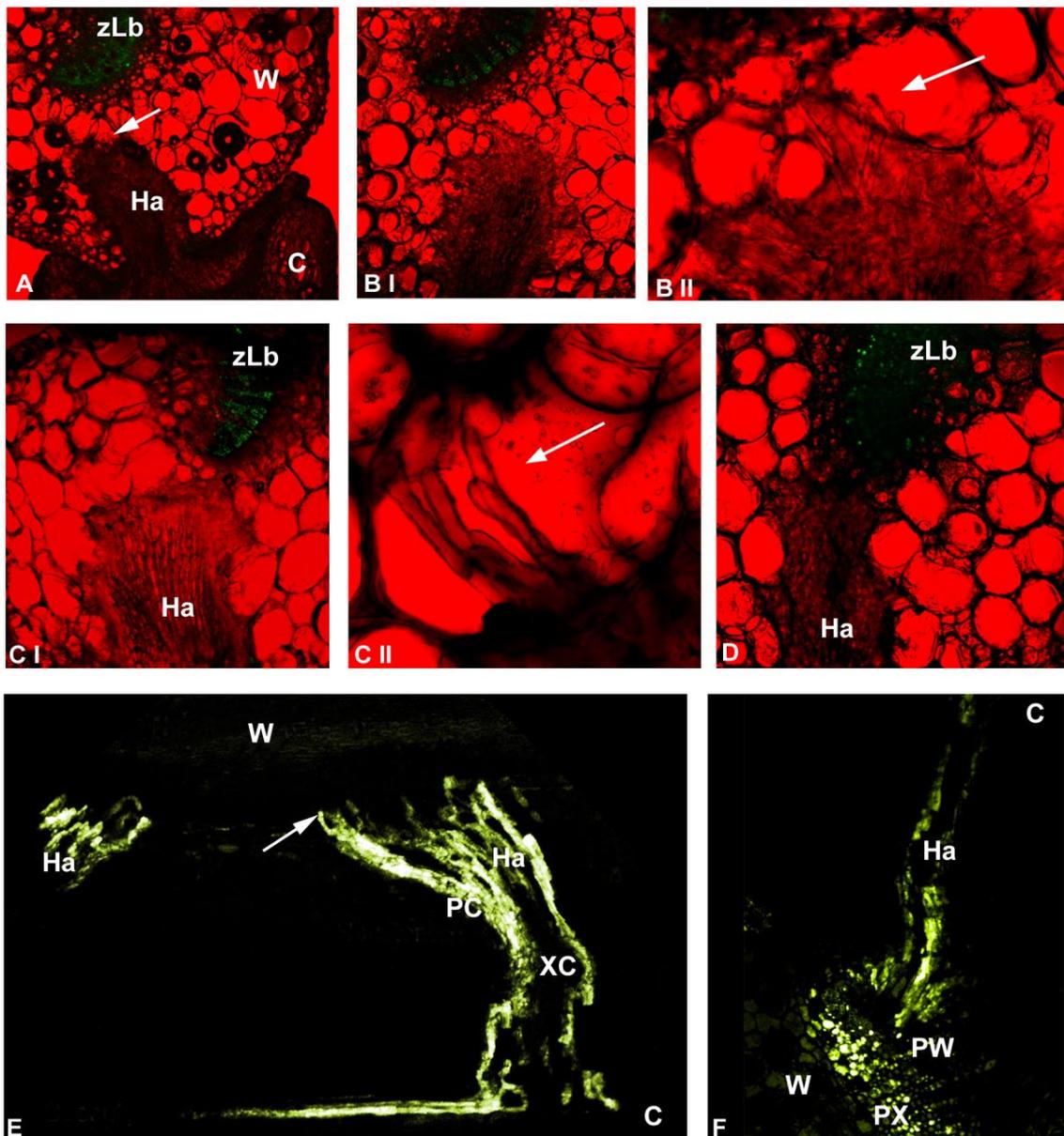
Translokation von HPTS

C - *Cuscuta*, Ha - Haustorium, PC - Phloem und Phloemparenchym von *Cuscuta*, PW - Phloem und Phloemparenchym vom Wirt, W - Wirt, XC - Xylem von *Cuscuta*, XW - Xylem des Wirtes

- (A) - Längsschnitt durch ein Haustorium im Spross von *Nicotiana benthamiana*.  
I - Transmissionsaufnahme, II - Translokation von HPTS. Vergrößerung 1 : 40.  
(B) - Längsschnitt durch ein Haustorium von *Cuscuta reflexa*. Der Farbstoff dringt in die Zellkerne (Pfeil) ein, jedoch nicht in die Vakuole. Vergrößerung 1 : 600.

Zur Untersuchung des Übertritts von CF während der Ausbildung des Phloemkontaktes wurden *N. benthamiana* Blattstiele von „sink“-Blättern im „parallelen“ Induktionsmodus mit *Cuscuta* parasitiert. Am 4., 6., 8., 10., 12. und 14. Tag der Parasitierung wurde an die unteren source-Blätter CFDA appliziert. Nach 1,5 Stunden erfolgte die Betrachtung der Freihandschnitte der parasitierten Blattstiele im Konfokalen Laser Scanning Mikroskop. Beispielhafte Bilder wurden in Abbildung 3.19 zusammengestellt. Ab dem sechsten Tag der Parasitierung konnte an der Spitze der in das Wirtsgewebe eingedrungenen Haustorien die Ausbildung von Suchhyphen beobachtet werden. Zwei Tage später begannen die Suchhyphen in die umgebenden Parenchymzellen des Wirtes einzudringen (siehe Bild BI und II). Auch 10 Tage nach Ansetzen des Parasiten hatten die Suchhyphen noch nicht das Phloem des Wirtes erreicht (Bild C). Ab dem 12. Tag der Parasitierung waren die meisten Haustorien bis zu den Leitbündel der Wirtsblattstiele vorgedrungen. Es konnten sowohl Haustorien beobachtet werden, die noch keinen funktionellen Kontakt zum Wirtspfloem hergestellt hatten (Bild D), als auch Haustorien, in denen bereits ein Übertritt von CF in die *Cuscuta* stattfand (Bild E). Ab dem 14. Tag nach Ansetzen des Parasiten zeigten alle untersuchten Haustorien den Übertritt von CF vom Wirt in den Parasiten (Bild F).

Diese Bilder bestätigen die Ergebnisse der unter 3.1.2 beschriebenen Translokationsexperimente. Auch sie zeigten, daß zwischen dem 12. und dem 14. Tag nach Ansetzen des Parasiten eine funktionelle Verbindung zwischen Wirt und Parasit besteht.



**Abb. 3.19: Wirt-Parasit-System *Nicotiana benthamiana*-*Cuscuta reflexa***

Translokation von CF während der Ausbildung des Phloemkontaktes zwischen Wirt und Parasit. In den Bildern (A) bis (D) wurden die Fluoreszenz- und Transmissionsaufnahmen übereinander gelegt.

Die Bilder (A) bis (D) und (F) stellen Querschnitte durch mit *Cuscuta* parasitierte Blattstiele des Wirtes dar, Bild (E) ist ein Längsschnitt durch einen mit *Cuscuta* parasitierten Blattstiel von *N. benthamiana*.

(A) Parasitierungsdauer 6 Tage; (B) I Parasitierungsdauer 8 Tage, II Suchhyphen an der Spitze des Haustoriums durchwachsen die Parenchymzellen des Wirtes; (C) I Parasitierungsdauer 10 Tage, II Suchhyphen in Parenchymzelle des Wirtes; (D) Parasitierungsdauer 12 Tage, Haustorium hat das zentrale Leitbündel erreicht, es findet jedoch kein Übertritt von CF statt; (E) Parasitierungsdauer 12 Tage, dieses Haustorium stellte einen funktionalen Kontakt zu den Siebröhren des Wirtes her; (F) Parasitierungsdauer 14 Tage

C - *Cuscuta*, Ha - Haustorium, KH - Kontakthyphe, PC - Phloem und Phloemparenchym von *Cuscuta*, PW - Phloem und Phloemparenchym des Wirtes, W - Wirt, XC - Xylem und Xylemparenchym von *Cuscuta*, XW - Xylem und Xylemparenchym des Wirtes, zLb - zentrales Leitbündel des Wirtes

### 3.4.3 Untersuchungen zur Translokation des Kartoffel Virus X . GFP im Wirt-Parasit-System *Nicotiana benthamiana-Cuscuta reflexa*

Vom Kartoffel Virus X (PVX) ist bekannt, daß er symplastisch von Zelle zu Zelle wandert, aber auch über längere Entfernungen im Phloem mit den Assimilaten transportiert und an den sinks über Plasmodesmen entladen wird (ROBERTS et al., 1997).

Dem PVX wurde GFP (von der Meeresqualle *Aequorea victoria*) über eine Fusion an das Hüllprotein des Virus gebunden, so daß bei Replikation des PVX die RNA des viralen Hüllproteins zusammen mit der für GFP abgelesen wird und dadurch fluoreszierende Viruspartikel entstehen. Fand im Wirtsgewebe eine Replikation des Virus statt, lagerten sich die Viren zu Viruskonglomeraten von  $\approx 1$  Million Viren zusammen und konnten im Fluoreszenzlicht detektiert werden (Abbildung 3.20 B und C).

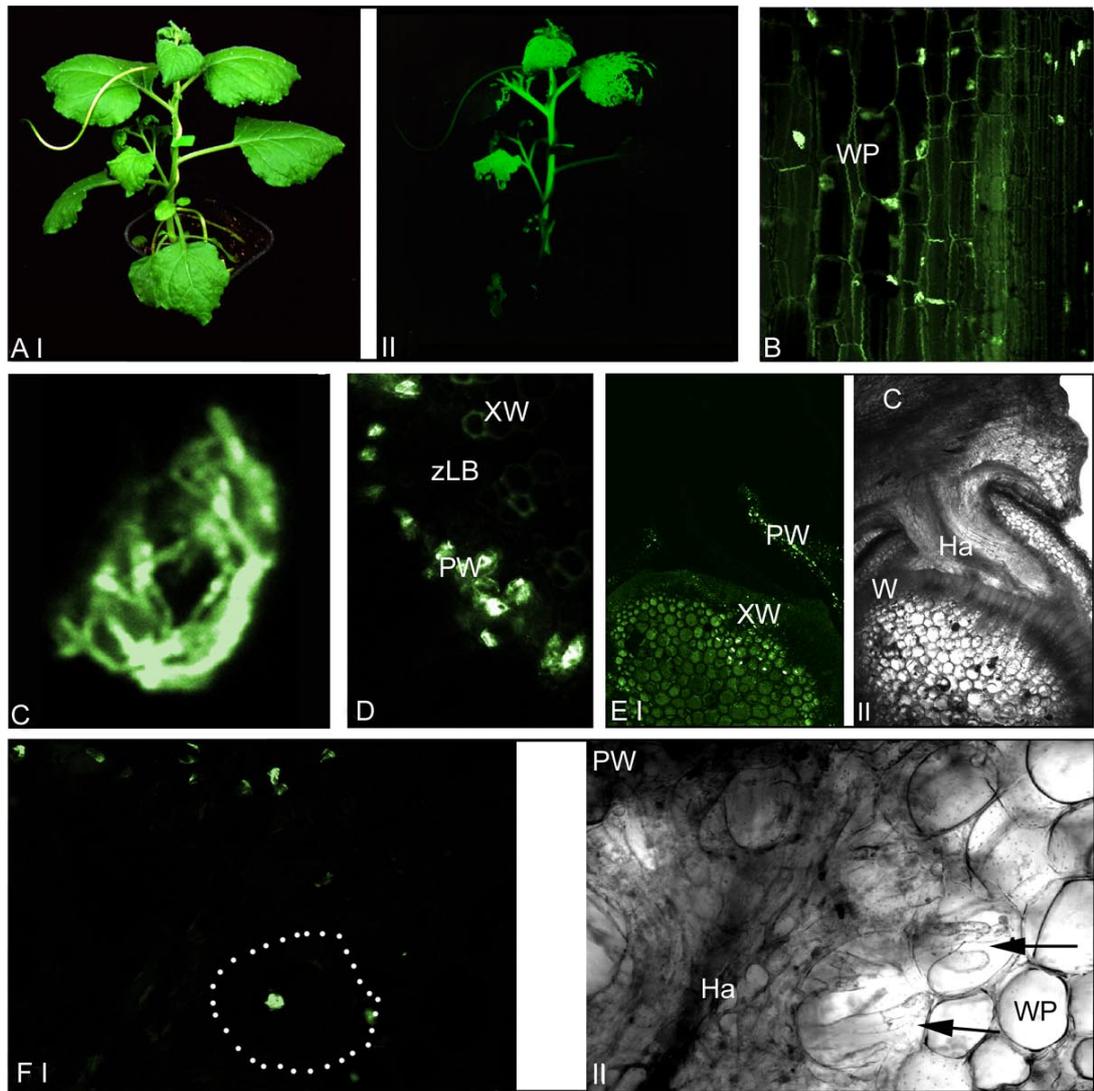
Zur Untersuchung der Translokation des Virus im Wirt-Parasit-System *Nicotiana benthamiana-Cuscuta reflexa* wurden an 6 bis 8 Wochen alten *Nicotiana benthamiana*-Pflanzen die „source“-Blätter zuerst mit PVX.GFP inokuliert und am folgenden Tag an den Blattstielen oder den Sproßachsen mit *Cuscuta reflexa* parasitiert. Im Verlauf einer Woche hatte sich der PVX.GFP systemisch in der Wirtspflanze ausgebreitet (siehe Abbildung 3.20 A I und II). 16 Tage nach Ansetzen der *Cuscuta* wurden die parasitierten Blattstiele bzw. Sproßachsen quer geschnitten, in Silikonöl eingebettet und unter dem Konfokalen Laser Scanning Mikroskop betrachtet. Insgesamt wurden mehr als 500 Querschnitte betrachtet und fotografisch dokumentiert. Repräsentative Photos wurden in Abbildung 3.20 zusammengestellt.

Abbildung 3.20 A zeigt das Wirt-Parasit-System mit systemisch ausgebreiteter Infektion von PVX.GFP. Die Viren wandern im inokulierten Blatt der Wirtspflanze (source) von Zelle zu Zelle bis sie ins Phloem gelangen. Von dort werden sie gemeinsam mit den Assimilaten zu den sinks transportiert und entladen. Entlang des path (Sproßachse) waren die Haustorien von *Cuscuta* in das Wirtsgewebe eingedrungen und hatten innerhalb von 2 Wochen einen funktionellen Kontakt zum Phloem des Wirtes hergestellt. Querschnitte der mit *Cuscuta* parasitierten Sproßachsen zeigten ein einheitliches Bild. Das in das Wirtsgewebe eindringende Haustorium hatte sich stets zwischen das Xylem und das anliegende Phloem geschoben (siehe Abb. 3.20 EII). An der Grenze zwischen Wirtsploem und Haustorium traten Viruskonglomerate in sehr hoher Dichte auf, während sie im restlichen Wirtsgewebe nur verstreut zu finden waren (Abb. 3.20 EI). Im Parasiten selbst, den Haustorien, der Achse oder in den wachsenden Spitzen konnten niemals fluoreszierende Viruskonglomerate gesehen werden. An den Seiten der Haustorien konnte oft beobachtet werden, wie Suchhyphen durch virusinfizierte Parenchymzellen hindurchwuchsen (FI und II).

Da im Konfokalen Laser Scanning Mikroskop keine Fluoreszenz im Parasiten gefunden werden konnte, wurden mit Hilfe molekularbiologischer Methoden versucht, eine Translokation des PVX.GFPs nachzuweisen. Für diese Untersuchungen wurden zwei *Nicotiana benthamiana*-Pflanzen durch *Cuscuta reflexa* miteinander verbunden (Brückeninfektion siehe Abbildung 2.1). Nach Inokulation der ersten Pflanze mit PVX.GFP und Parasitierung der Blattstiele der „source“-Blätter mit *Cuscuta reflexa*, wurde der Parasit auf eine zweite, virusfreie *Nicotiana benthamiana*-Pflanze übergeleitet. Nachdem *Cuscuta* innerhalb von 16 Tagen den Phloemkontakt in der zweiten Wirtspflanze ausgebildet hatte, wurden von beiden Wirten die „sink“-Blätter geerntet und auf virale Proteine bzw. RNA untersucht. Die Ergebnisse für ein beispielhaftes Wirtspflanzenpaar wurden in Abbildung 3.21 zusammengestellt.

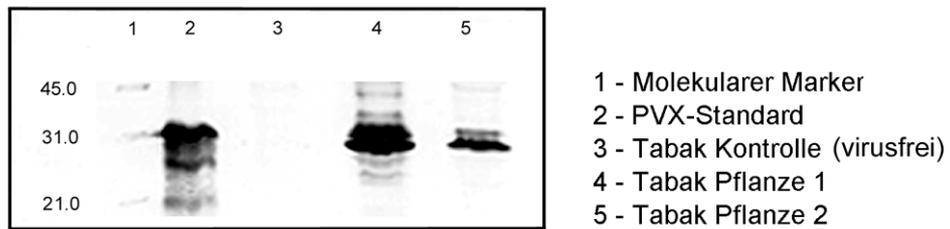
Für die Westernblotanalyse wurde der Wildtyp von PVX als Proteinstandard (Spur 2) verwendet. Als Kontrolle dienten „sink“-Blätter einer virusfreien *Nicotiana benthamiana* (Spur 3). Wie auf Spur 5 zu sehen ist, treten Virusproteine in der zweiten Wirtspflanze auf. Das Auftreten von Virusproteinen in der zweiten Wirtspflanze bedeutet, daß ein Transport der Viren durch *Cuscuta* in die zweite Wirtspflanze stattgefunden hat.

Auch durch RT-PCR konnte nachgewiesen werden, daß bei Brückeninfektionen eine Translokation des Virus durch den Parasiten stattgefunden hatte. Als Standard wurde PVX.GFP und für die Kontrolle sink-Blätter einer virusfreien *Nicotiana benthamiana* verwendet. Durch rekombinante Ereignisse kam es neben dem PVX.GFP zum Auftreten des PVX Wildtyps und mehrerer unvollständiger Genomformen von PVX und GFP. PVX.GFP hat eine Größe von 15415 Basenpaaren, der Wildtyp PVX ist hingegen nur 9661 Basenpaare groß. Die in beiden Wirtspflanzen außerdem auftretenden Banden stellen Rekombinanten dar. In der ersten Wirtspflanze (Spur 5) war im Vergleich zu der zweiten Wirtspflanze (Spur 6) der Anteil an Rekombinanten höher.



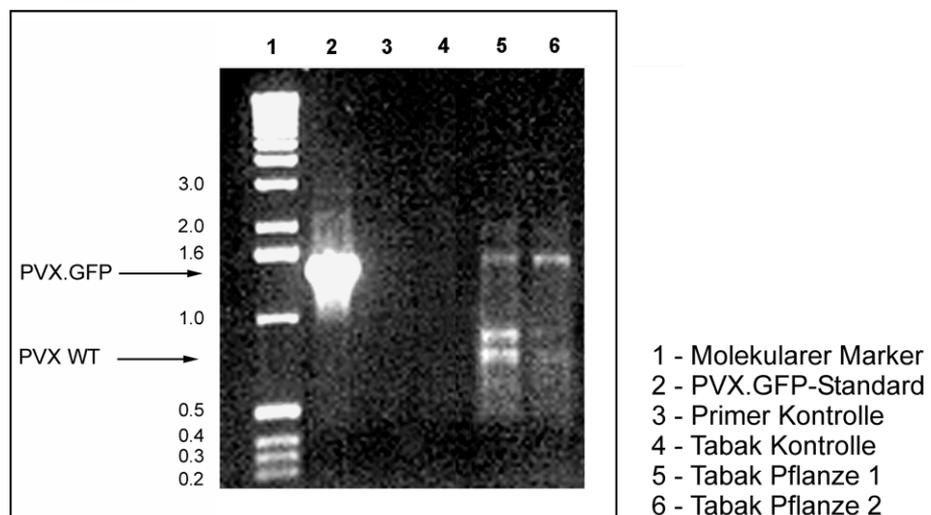
**Abb. 3.20: Wirt-Parasit-System *Nicotiana benthamiana*-*Cuscuta reflexa***

Translokation von *PVX.GFP*. (A) - das Wirt-Parasit-System I - Tageslichtaufnahme, die Virusinfektion ist systemisch, alle "sink"-Gewebe fluoreszieren grün; II - Fluoreszenzlichtaufnahme; (B) - Längsschnitt durch einen Blattstiel von *N. benthamiana* nach 10 tägigem Virusbefall. Vergrößerung 1:800; (C) - Viruskonglomerat in einer Parenchymzelle von *N. benthamiana*, Vergrößerung 1:2400; (D) - Querschnitt durch den Blattstiel eines mit *PVX.GFP* inokulierten "source"-Blattes von *N. benthamiana*, Vergrößerung 1:400; (E) - Querschnitt durch einen seit 16 Tagen mit *Cuscuta* parasitierten Sproß einer systemisch mit *PVX.GFP* infizierten *N. benthamiana*, Vergrößerung 1:100; I - Fluoreszenzlichtaufnahme, II - Transmissionsaufnahme; (F) - Querschnitt durch einen seit 10 Tagen mit *Cuscuta* parasitierten Blattstiel einer systemisch mit *PVX.GFP* infizierten *N. benthamiana*, zahlreiche Suchhyphen (FII, Pfeile) durchwachsen intrazellulär das Gewebe des Wirtes. Einige dieser Wirtszellen weisen fluoreszierende Viruskonglomerate auf (FI, weiße Punktlinie). Vergrößerung 1:400; I - Fluoreszenzlichtaufnahme, II - Transmissionsaufnahme.  
C - *Cuscuta*, Ha - Haustorium, PW - Phloem des Wirtes, W - Wirt, WP - Wirtsparenchym, XW - Xylem des Wirtes, zLB - zentrales Leitbündel



**(A)** Western Blot Analyse von sink-Blättern beider an der Brückeninfektion beteiligten Wirtspflanzen

Ein source-Blatt der Pflanze 1 wurde mit PVX.GFP inokuliert und anschließend am Sproß mit *Cuscuta* parasitiert. Nach 7 Tagen wurde der wachsende Sproß des Parasiten auf die zweite, virusfreie Wirtspflanze (Pflanze 2) übergeleitet.



**(B)** RT-PCR Analyse von sink-Blättern beider an der Brückeninfektion beteiligten Wirtspflanzen

Ein source-Blatt der Pflanze 1 wurde mit PVX.GFP inokuliert und anschließend am Sproß mit *Cuscuta* parasitiert. Nach 7 Tagen wurde der wachsende Sproß des Parasiten auf die zweite, virusfreie Wirtspflanze (Pflanze 2) übergeleitet.

**Abb. 3.21: Wirt-Parasit-System *Nicotiana benthamiana*-*Cuscuta reflexa***

Nachweis der Translokation des Kartoffelvirus X mittels Westernblotanalyse (A) und RT-PCR (B).

### 3.4.4 Untersuchungen zur Translokation von GFP (green fluorescent protein) im Wirt-Parasit-System *Nicotiana tabacum* cv. Sumsai AT-SUC II-*Cuscuta reflexa*

Gentechnisch modifizierte *Nicotiana tabacum*-Pflanzen, die in ihren Geleitzellen GFP unter Kontrolle des Promoters des *Arabidopsis*-Saccharosetransporters AtSUC 2 exprimieren (IMLAU et al., 1999) wurden benutzt, um eine symplastische Verbindung zwischen dem Phloem der Wirtspflanze und den Haustorien von *Cuscuta* nachzuweisen. Der Saccharosetransporter AtSUC 2 kommt ausschließlich in Geleitzellen vor und dient der Beladung von Saccharose. Das exprimierte GFP wird in source-Blättern gemeinsam mit den Assimilaten ins Phloem beladen und an Orten des sinks entladen. Aufgrund der Größe des Proteins (27 kD) kann eine apoplastische Phloementladung durch Diffusion ausgeschlossen und von rein symplastischen Transport und symplastischen Entladung ausgegangen werden (IMLAU et al., 1999).

Für die Untersuchungen wurden Blattstiele bzw. Sproßachsen von *Nicotiana tabacum*-Blättern im gewundenen Modus mit *Cuscuta* parasitiert. Nach 16 Tagen wurden von den parasitierten Bereichen Freihandschnitte angefertigt, in Silikonöl eingebettet und unter dem Konfokalen Laser Scanning Mikroskop betrachtet. Beispielhafte Aufnahmen sind in den Abbildungen 3.22 und 3.23 zusammengestellt.

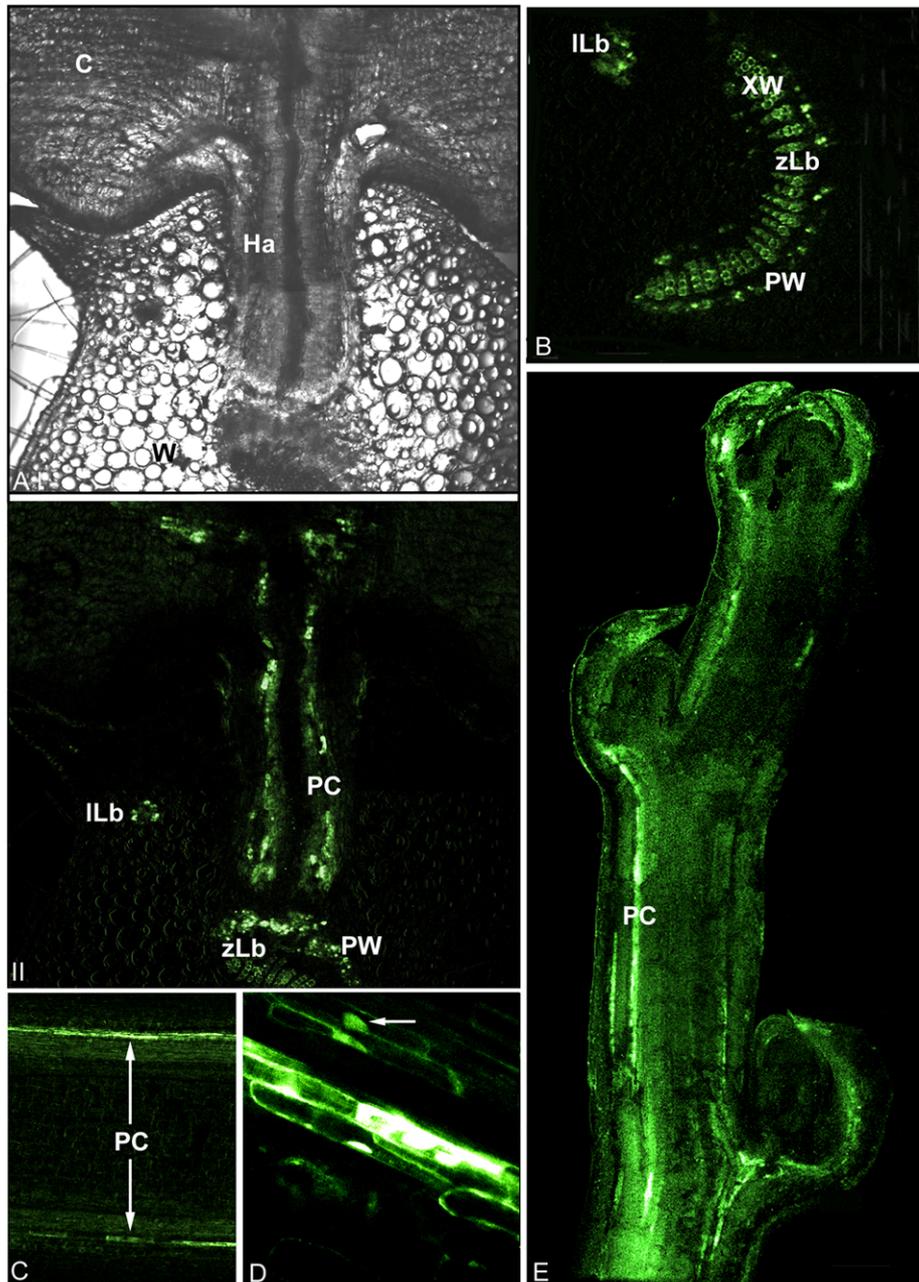
Durch die Parasitierung der Blattstiele bzw. Sproßachsen mit *Cuscuta* kam es zu einer Entladung des Phloems an der Kontaktstelle zwischen Wirt und Parasit (Abbildung 3.22 AI und II).

Bild AI zeigt die Transmissionsaufnahme eines Querschnittes durch den parasitierten Blattstiel von *Nicotiana tabacum* mit dem Haustorium des Parasiten. Bild AII stellt die Fluoreszenzlichtaufnahme desselben Schnittes dar. Das im Cytoplasma der Zellen vorliegende GFP bildet ein durchgehendes grünes Band von den Siebröhren des Wirtes durch das Haustorium bis in die Leitbündel der Sproßachse des Parasiten. Im lateralen Bündel des Blattstieles (ILb), das nicht parasitiert wurde, ist hingegen keine Entladung des GFPs in das umgebende Gewebe des Wirtes zu beobachten.

Entlang des path (Blattstiel des Wirtes) kommt es nicht zur Entladung von GFP in parenchymatisches Gewebe (Abbildung 3.22 B). Es waren nur Siebröhren und Geleitzellen markiert (Abb. 3.22 C). Bei größerer Vergrößerung war zu erkennen, daß GFP nur im Cytoplasma der Zellen vorliegt und nicht in den Vakuolen (Abb. 3.22 D). Erst in der Sproßspitze (Abb. 3.22 E) und den Seitensprossen der *Cuscuta* kam es zu einer symplastischen Entladung des GFPs in das umliegende parenchymatische Gewebe.

Bild 3.23 AII zeigt große Übereinstimmungen mit den Abbildungen der Translokation der symplastischen Fluoreszenzmarker CF und HPTS. In diesen beiden Fällen gab es am Ort des Kontaktes zwischen Wirtssiebröhre und Parasitenhyphe keinerlei Hinweise auf einen

parenchymatischen, symplastischen Bypass. Es war vielmehr ein direkter Kontakt zwischen den Phloemelementen beider Organismen zu erkennen (siehe Abbildung 3.23 AIII, Pfeil).

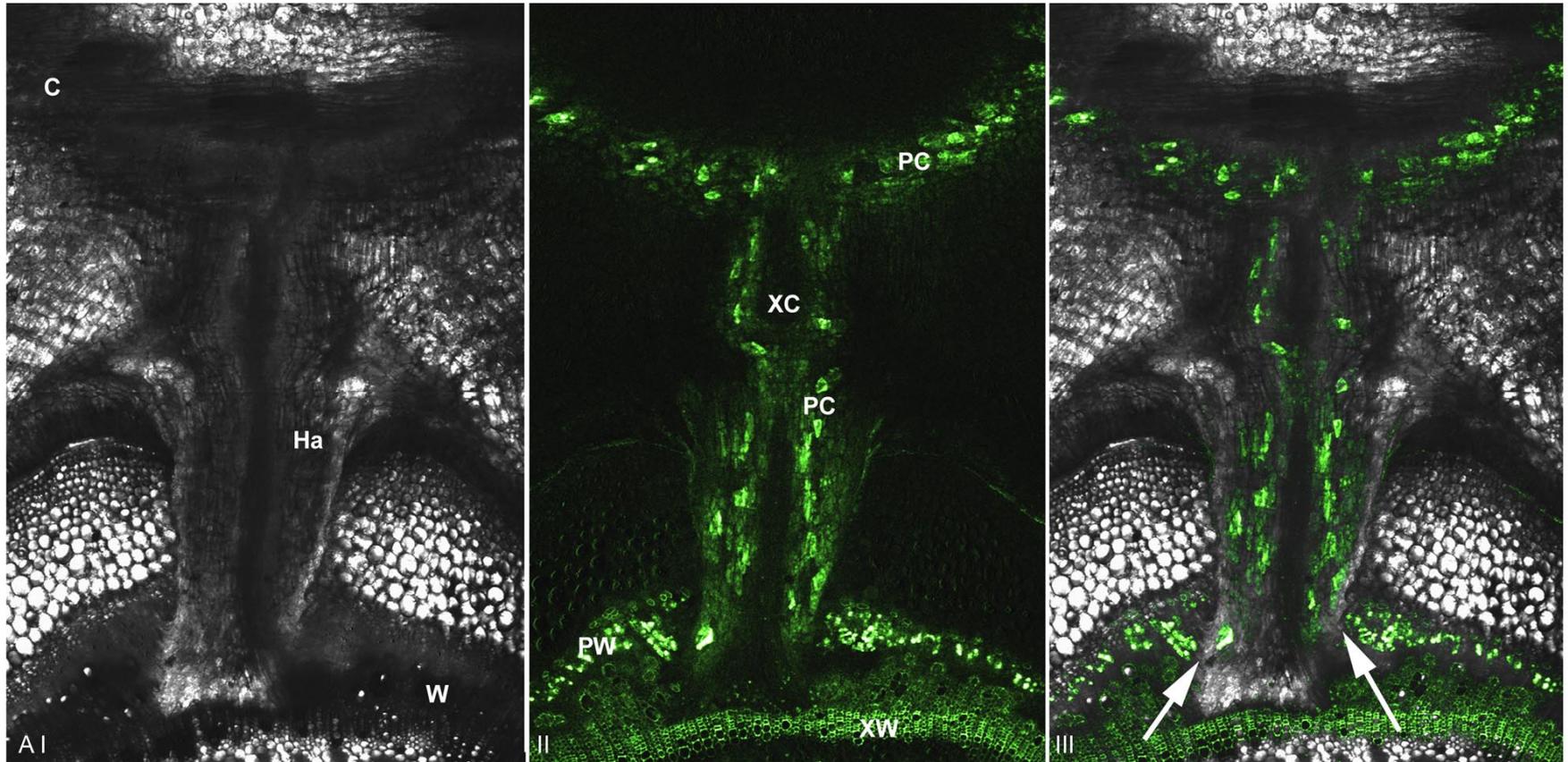


**Abb.: 3.22: Wirt-Parasit-System *Nicotiana tabacum* AtSUC 2-*Cuscuta reflexa***

Translokation von GFP nach Expression in den Geleitzellen des Wirtes unter Kontrolle des AtSUC2-Promotors

- (A) I - Transmissionsaufnahme eines Freihandquerschnittes durch einen Blattstiel von *Nicotiana tabacum*. Ein Haustorium von *Cuscuta* parasitiert das zentrale Leitbündel (zLB). Vergrößerung 1:40; II Fluoreszenzaufnahme von (A I) Vergrößerung 1:40.  
 (B) Querschnitt durch einen nicht parasitierten Blattstiel von *Nicotiana tabacum*. Translokation von GFP in den Siebröhren. Es findet keine Entladung in das umgebende Parenchym statt. Vergrößerung 1:80.  
 (C) Längsschnitt durch die Sprossachse von *Cuscuta* entlang des path, GFP wird im Phloem transportiert. Vergrößerung 1:12.  
 (D) Ausschnittsvergrößerung von (C) 1:100. GFP befindet sich im Cytoplasma der Zellen und im Zellkern (Pfeil).  
 (E) Längsschnitt durch die Spitze einer *Cuscuta*-Achse. Symplastische Entladung von GFP in den "sink". Vergrößerung 1:25.

C - *Cuscuta*, Ha - Haustorium, ILB laterales Leitbündel des Wirtes, PC - Phloem und Phloemparenchym von *Cuscuta*, PW - Phloem und Phloemparenchym des Wirtes, W - Wirt, XW - Xylem des Wirtes, zLB - zentrales Leitbündel des Wirtsblattstieles



**Abb. 3.23: Wirt-Parasit-System *Nicotiana tabacum* *AtSUC 2-Cuscuta reflexa***

Translokation von GFP

(A) Freihandquerschnitt durch einen von *Cuscuta reflexa* parasitierten Spross von *Nicotiana tabacum*. Ein Haustorium (Längsschnitt) von *Cuscuta* parasitiert das Leitbündel. I - Transmissionsaufnahme; II - Fluoreszenzaufnahme von (AI); III - Überlagerung von Transmissions- und Fluoreszenzaufnahme. Pfeile markieren die Orte des Übertritts von GFP aus dem Phloem des zentralen Leitbündel des Blattstieles in die Kontakthyphen des Parasiten. Vergrößerung 1:50.

C - *Cuscuta*, Ha - Haustorium, PC - Phloem und Phloemparenchym von *Cuscuta*, PW - Phloem und Phloemparenchym des Wirtes, W - Wirt, XC - Xylem von *Cuscuta*, XW - Xylem des Wirtes

#### 4 TABELLENVERZEICHNIS

**Tab. 4.1: Isolierte Blätter von *Pelargonium zonale***

**Translokationsraten und Verteilungsmuster der transportierten radioaktiv markierten Verbindungen in isolierten Blattstielen von *Pelargonium zonale* Applikation von  $^{14}\text{CO}_2$  an die Blattspreite**

Die fünfminütige Applikation von  $^{14}\text{CO}_2$  erfolgte an die Blattspreite des Wirtes; nach einer Translokationszeit von 3-72 Stunden wurde die Radioaktivität der methanollöslichen Fraktion der einzelnen Pflanzenabschnitte bestimmt. n = 10. Mittelwerte  $\pm$  SF 95% Konfidenzgrenzen.

Prozentualer Anteil an transportierten $^{14}\text{C}$ -Verbindungen nach				
Abschnitt	3 Stunden	6 Stunden	24 Stunden	72 Stunden
Blattstiel oben	75,8 $\pm$ 5,3	64,6 $\pm$ 10,5	42,1 $\pm$ 6,2	28,3 $\pm$ 1,9
Blattstiel Mitte	19,9 $\pm$ 4,1	27,0 $\pm$ 5,6	35,1 $\pm$ 0,8	30,6 $\pm$ 1,9
Blattstiel unten	4,1 $\pm$ 1,2	8,1 $\pm$ 5,8	22,7 $\pm$ 5,6	41,0 $\pm$ 3,5
Puffer	0,2 $\pm$ 0,1	0,3 $\pm$ 0,1	0,1 $\pm$ 0,1	0,1 $\pm$ 0,03
Translokationsrate	14,2 $\pm$ 6,9	29,5 $\pm$ 11,5	62,9 $\pm$ 16,1	80,5 $\pm$ 5,2

**Tab. 4.2: Wirt-Parasit-System *Pelargonium-Cuscuta***

**Veränderung der Translokationsrate und des Verteilungsmusters der transportierten <sup>14</sup>C-Verbindungen im Verlauf der Parasitierung. Vergleich zwischen “gewundenem” und “parallelem” Induktionsmodus**

Ansetzen des Parasiten = 0 Tage, 5minütige Begasung der Wirtsblattspreite mit <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>, Translokationszeit 3 Stunden, Methanolextraktion ohne Fraktionierung. n = 10. (SF ± 95 % Konfidenzgrenzen).

Abschnitt	Tage nach dem Ansetzen des Parasiten						
	4	6	8	10	12	14	16
Induktionsmodus “gewunden”							
BS oben	45,5 ± 2,6	50,2 ± 5,0	54,1 ± 18,2	26,4 ± 3,5	7,3 ± 1,1	9,6 ± 1,3	8,7 ± 1,2
BS + HK	39,5 ± 3,3	35,5 ± 5,5	31,5 ± 12,5	31,0 ± 16,0	25,6 ± 2,8	24,9 ± 2,1	15,9 ± 3,3
BS unten	14,8 ± 4,4	13,4 ± 5,5	10,6 ± 0,5	8,2 ± 3,1	3,9 ± 1,9	3,3 ± 1,9	3,7 ± 0,5
Cu gesamt	<b>0,2 ± 0,03</b>	<b>0,9 ± 0,3</b>	<b>3,8 ± 2,8</b>	<b>34,4 ± 6,3</b>	<b>63,2 ± 5,3</b>	<b>62,2 ± 4,6</b>	<b>71,7 ± 9,5</b>
Translokationsrate	<b>26,1 ± 5,1</b>	<b>30,3 ± 6,9</b>	<b>28,6 ± 3,9</b>	<b>46,8 ± 8,2</b>	<b>51,6 ± 6,9</b>	<b>68,9 ± 3,3</b>	<b>63,5 ± 6,4</b>
Induktionsmodus “parallel”							
BS oben	48,3 ± 3,1	49,7 ± 4,4	43,2 ± 5,2	23,2 ± 2,2	14,8 ± 3,1	14,5 ± 3,3	7,2 ± 5,1
BS + HK	30,6 ± 2,9	24,3 ± 2,8	36,9 ± 2,4	29,8 ± 2,2	17,9 ± 2,9	17,7 ± 4,1	9,6 ± 4,4
BS unten	20,6 ± 3,3	21,8 ± 4,7	6,7 ± 2,3	4,9 ± 1,5	1,5 ± 0,4	6,3 ± 1,4	4,3 ± 1,1
Cu gesamt	<b>0,5 ± 0,2</b>	<b>4,2 ± 2,4</b>	<b>13,2 ± 7,1</b>	<b>42,1 ± 18,8</b>	<b>65,8 ± 3,4</b>	<b>61,5 ± 1,3</b>	<b>78,9 ± 2,9</b>
Translokationsrate	<b>21,2 ± 4,7</b>	<b>24,9 ± 9,4</b>	<b>28,1 ± 12,8</b>	<b>62,2 ± 18,6</b>	<b>60,6 ± 13,3</b>	<b>62,7 ± 4,2</b>	<b>71,0 ± 6,6</b>

**Tab. 4.3: Wirt-Parasit-System *Pelargonium-Cuscuta*  
Verteilungsmuster der transportierten radioaktiv markierten Verbindungen in den  
Abschnitten des W-P-S.**

Manipulationen am Parasiten wurden 24 Stunden vor Versuchsbeginn ausgeführt. 5minütige Begasung der Wirtsblattspreite mit  $^{14}\text{CO}_2$ , Translokationszeit 3 - 72 Stunden, Bestimmung der Radioaktivität der methanollöslichen Fraktionen; n = 6 ± SF.

Anteil der radioaktiv markierten Assimilate [ % ]				
Abschnitt	3 Stunden	6 Stunden	24 Stunden	72 Stunden
<b>intaktes Wirt-Parasit-System</b>				
Blattstiel oberhalb der Parasitierung	6,5 ± 2,4	4,4 ± 2,0	1,4 ± 0,1	1,0 ± 0,3
Blattstiel mit Haustorien	5,9 ± 1,1	7,2 ± 1,8	2,8 ± 0,7	1,7 ± 0,5
Blattstiel unterhalb der Parasitierung	0,8 ± 0,7	0,3 ± 0,1	0,4 ± 0,2	0,2 ± 0,1
<b>Cuscuta</b>	<b>86,8 ± 2,9</b>	<b>88,1 ± 2,0</b>	<b>95,4 ± 1,0</b>	<b>97,1 ± 0,7</b>
Translokationsrate	69,9 ± 11,4	78,1 ± 3,6	83,7 ± 2,4	95,5 ± 1,2
<b>Parasit wird auf die dem Wirtsblattstiel parallel Achse verkürzt</b>				
Blattstiel oberhalb der Parasitierung	10,8 ± 2,8	8,6 ± 1,6	3,1 ± 0,9	2,8 ± 0,7
Blattstiel mit Haustorien	29,8 ± 5,8	20,5 ± 3,9	20,4 ± 2,9	7,4 ± 1,0
Blattstiel unterhalb der Parasitierung	2,3 ± 2,3	2,2 ± 0,7	0,3 ± 0,1	2,1 ± 0,8
<b>Cuscuta</b>	<b>57,1 ± 8,5</b>	<b>68,7 ± 4,7</b>	<b>76,2 ± 3,6</b>	<b>87,7 ± 2,3</b>
Translokationsrate	36,5 ± 1,3	35,5 ± 4,9	66,6 ± 9,9	79,6 ± 7,6
<b>Parasit wird auf die im Wirtsblattstiel befindlichen Haustorien verkürzt</b>				
Blattstiel oberhalb der Parasitierung	29,2 ± 5,8	27,1 ± 5,2	16,0 ± 2,2	14,0 ± 3,6
Blattstiel mit Haustorien	<b>56,2 ± 6,8</b>	<b>59,6 ± 7,9</b>	<b>65,6 ± 4,0</b>	<b>75,2 ± 4,7</b>
Blattstiel unterhalb der Parasitierung	14,6 ± 1,2	13,3 ± 4,5	18,4 ± 3,5	10,8 ± 2,1
Translokationsrate	46,2 ± 8,5	72,0 ± 5,0	82,8 ± 3,3	87,9 ± 2,6

**Tab. 4.4: Wirt-Parasit-System *Pelargonium-Cuscuta*  
Bestimmung der Aktivität der zellwandgebundenen sauren Invertase in definierten  
Abschnitten**

Ansetzen des Parasiten an den Wirt = Tag 0, Mischproben von je 4 W-P-S.

Zellwandgebundene saure Invertase [ $\mu\text{mol Glu/mg ZW}^*\text{min}$ ]					
Pflanzenabschnitt	Dauer der Parasitierung				
	8 Tage	10 Tage	12 Tage	14 Tage	16 Tage
Blattstiel oben	0,044	0,042	0,058	0,072	0,044
Blattstiel mit Haustorien	0,036	0,034	0,028	0,042	0,038
Blattstiel unten	0,022	0,018	0,022	0,024	0,024
<i>Cuscuta</i> parallel	0,006	0,020	0,010	0,004	0,004
<i>Cuscuta</i> -Achse	0,022	0,016	0,004	0,010	0,026
<i>Cuscuta</i> -Spitze	0,166	0,174	0,218	0,206	0,176

**Tab. 4.5: Wirt-Parasit-System *Pelargonium zonale*-*Cuscuta reflexa*  
Verteilungsmuster der radioaktiv markierten Verbindungen nach dreistündiger  
Translokationszeit in den basipetalen Abschnitten des Wirt-Parasit-Systems.**

Die Injektion der Substanzen erfolgte in gepuffertem Medium (10mM MES, pH 5,0) in den oberen Blattstielabschnitt. Die Translokationszeit betrug 3 Stunden. Bestimmung des Radioaktivitätsgehaltes der methanollöslichen Fraktion. n = 10. Mittelwerte  $\pm$  SF 95% Konfidenzgrenzen

MCPA - Methylchlorphenoxyessigsäure, 2,4-D – 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure, AIB –  $\alpha$ -Aminoisobuttersäure.

Prozentuale Verteilung der radioaktiv markierten Verbindungen			
Substanz	Blattstiel mit Haustorien	Blattstiel unten	Cuscuta gesamt
Saccharose	31,6 $\pm$ 3,7	1,2 $\pm$ 0,6	<b>67,0 <math>\pm</math> 3,9</b>
Alanin	36,9 $\pm$ 6,4	3,7 $\pm$ 1,8	<b>59,4 <math>\pm</math> 4,9</b>
Leucin	35,3 $\pm$ 5,6	3,2 $\pm$ 1,6	<b>61,5 <math>\pm</math> 6,2</b>
AIB	30,7 $\pm$ 6,8	4,9 $\pm$ 1,7	<b>64,4 <math>\pm</math> 5,4</b>
Abscisinsäure	44,2 $\pm$ 4,2	0,8 $\pm$ 0,1	<b>55,0 <math>\pm</math> 5,2</b>
Indolylessigsäure	26,1 $\pm$ 3,4	8,3 $\pm$ 2,9	<b>65,6 <math>\pm</math> 3,8</b>
2,4-D	32,4 $\pm$ 4,8	0,7 $\pm$ 0,3	<b>62,3 <math>\pm</math> 2,7</b>
MCPA	41,9 $\pm$ 8,4	1,9 $\pm$ 0,7	<b>56,2 <math>\pm</math> 8,2</b>
Glyphosat	32,0 $\pm$ 3,7	5,1 $\pm$ 2,1	<b>62,9 <math>\pm</math> 4,8</b>

**Tab. 4.6: Wirt-Parasit-System *Nicotiana tabacum-Cuscuta reflexa***  
**Verteilungsmuster der radioaktiv markierten Verbindungen der methanollöslichen Fraktion nach Auftropfen von  $^{14}\text{C}$ -Saccharose Wirtsspreite**

$^{14}\text{C}$ -Saccharose wurde auf die mit Sandpapier angeraute Wirtsspreite aufgetropft. Die Stelle wurde mehrfach mit MES-Puffer nachgefeuchtet. Nach 12 Stunden wurde der Radioaktivitätsgehalt der methanollöslichen Fraktion der einzelnen Pflanzenabschnitte bestimmt. (Bezug auf aufgenommene Radioaktivität: Gesamtradioaktivität aller Abschnitte = 100%; Bezug auf austransportierte Radioaktivität: Radioaktivität außerhalb der Fütterungsstelle = 100%). n = 4. Mittelwerte  $\pm$  SF 95% Konfidenzgrenzen.

Pflanzenabschnitt	Verteilungsmuster bezogen auf	
	aufgenommene Radioaktivität (%)	austransportierte Radioaktivität (%)
Fütterungsstelle	44,2 $\pm$ 9,7	-----
Spreite	4,0 $\pm$ 0,7	7,1 $\pm$ 1,5
Blattstiel + Haustorien	1,7 $\pm$ 0,2	3,1 $\pm$ 0,4
Blattstiel unten	0,9 $\pm$ 0,5	1,6 $\pm$ 0,9
<i>Cuscuta</i> gewunden	8,8 $\pm$ 2,4	-----
<i>Cuscuta</i> -Achse	26,3 $\pm$ 5,4	-----
<i>Cuscuta</i> -Spitze	14,1 $\pm$ 4,8	-----
<i>Cuscuta</i> gesamt	<b>49,2 <math>\pm</math> 6,4</b>	<b>88,2 <math>\pm</math> 7,2</b>
Translokationsrate	55,8 $\pm$ 8,9	55,8 $\pm$ 8,9

**Tab. 4.7: Wirt-Parasit-System *Nicotiana benthamiana*-*Cuscuta reflexa*  
Verteilungsmuster der radioaktiv markierten Verbindungen der methanollöslichen Fraktion nach Auftropfen von <sup>14</sup>C-Saccharose Wirtsspreite**

<sup>14</sup>C-Saccharose wurde auf die mit Sandpapier angeraute Wirtsspreite aufgetropft. Die Stelle wurde mehrfach mit MES-Puffer nachgefeuchtet. Nach 12 Stunden wurde der Radioaktivitätsgehalt der methanollöslichen Fraktion der einzelnen Pflanzenabschnitte bestimmt. (Bezug auf aufgenommene Radioaktivität: Gesamtradioaktivität aller Abschnitte = 100%; Bezug auf autransportierte Radioaktivität: Radioaktivität außerhalb der Fütterungsstelle = 100%). n = 4. Mittelwerte ± SF 95% Konfidenzgrenzen.

Pflanzenabschnitt	Verteilungsmuster bezogen auf	
	aufgenommene Radioaktivität (%)	austransportierte Radioaktivität (%)
Fütterungsstelle	38,6 ±	-----
Spreite	1,8 ± 0,8	2,9 ± 1,3
Blattstiel + Haustorien	7,5 ± 3,1	12,2 ± 5,0
Blattstiel unterhalb	3,1 ± 0,6	5,1 ± 1,0
<i>Cuscuta</i> gewunden	5,1 ± 1,3	-----
<i>Cuscuta</i> -Achse	22,2 ± 4,6	-----
<i>Cuscuta</i> -Spitze	21,7 ± 3,8	-----
<i>Cuscuta</i> gesamt	<b>49,0 ± 5,1</b>	<b>79,8 ± 8,3</b>
Translokationsrate	61,4 ± 7,4	61,4 ± 7,4

## 5 DISKUSSION

### 5.1 Methodische Aspekte

#### Standardisierung des Wirt-Parasit-Systems *Pelargonium-Cuscuta*

Um den Übertritt von Substanzen aus dem Phloem des Wirtes in den Parasiten *Cuscuta reflexa* zu analysieren, war die Etablierung eines Wirt-Parasit-Systems mit übersichtlichen source-sink-Beziehungen eine wichtige Voraussetzung. Bei der Verwendung von Ganzpflanzen als Wirt ist man mit einem komplexen Phloemnetzwerk konfrontiert, das „sources“ und „sinks“ unterschiedlicher Stärke und Entwicklungsstadien miteinander verbindet. Die sich daraus ergebende breite Variabilität der Verteilungsmuster macht eine Standardisierung des Versuchsmaterials außerordentlich schwierig. Die Stellung des Blattes an der Sproßachse, seine Entfernung zu einem sink sowie dessen entwicklungsabhängige Stärke entscheiden, in welcher Richtung der Transport aus dem Blatt erfolgt. So können in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium Assimilate aus den Blättern in den Leitbündeln der Sproßachse sowohl in basipetaler als auch in akropetaler Richtung zu den sinks transportiert werden. Die aus einem bestimmten Blatt in den Parasiten gelangende Stoffmenge ist damit von mehreren Größen abhängig: Von der Stellung des Blattes, ob oberhalb oder unterhalb der Ansatzstelle des Parasiten, von der Beziehung und Entfernung zwischen Blatt und natürlichem sink sowie von dem Verhältnis zwischen der Stärke der natürlichen sinks und der sink-Stärke von *Cuscuta*. In den von uns als Wirt verwendeten isolierten Blättern von *Pelargonium zonale* fallen diese nur schwer zu standardisierenden Faktoren weg. Die Spreite des Blattes bildet den „source“, der relativ lange als Parasitierungsort gut geeignete Blattstiel den „path“, die EDTA-haltige Pufferlösung am unteren Ende den „sink“, der mit *Cuscuta* um die aus dem Blatt transportierten Substanzen konkurriert. Durch Auswahl von Blättern gleichen Alters, meßbar an der Blattfläche, und vergleichbarer Blattstiellänge läßt sich das Versuchsmaterial relativ leicht standardisieren.

Leider war es bei *Nicotiana benthamiana* und *Nicotiana tabacum* wegen des schnellen Turgeszenzverlustes nach Abtrennen der Blätter und zu kurzer Blattstiele nicht möglich, wie bei *Pelargonium* einzelne Blätter als „Wirtspflanzen“ zu verwenden. Außerdem erforderten die Versuche zur Translokation von Viren ganze Pflanzen, da eine Übertragung von Viren durch *Cuscuta* auf eine zweite Wirtspflanze nur durch das Auftreten von Infektionen in „sink“-Blättern nachgewiesen werden kann.

Um bei der Aufarbeitung eine möglichst genaue Trennung zwischen Wirt und Parasitengewebe zu erreichen, wurde bei der Infektion der Blattstiele versucht, die

Parasitierung mit *Cuscuta* auf den mittleren Abschnitt und in diesem Bereich nur auf eine Flanke zu begrenzen. Dieser „parallele Induktionsmodus“ bringt noch einen weiteren Vorteil: Beim Befall von Wirtspflanzen unter natürlichen Bedingungen umwindet der Parasit mit seiner Sproßachse das jeweilige Wirtsorgan in Linksrichtung („gewundener Induktionsmodus“; Abb.2.1 A). Durch den dadurch entstehenden Kontaktreiz (IHL & WIESE, 2000) wird die Bildung von Haustorien ausgelöst. Da aber das Umwinden einer Blattstiellänge von 3-4cm ungefähr zwei Tage in Anspruch nimmt, ist auch die Entwicklung der einzelnen Haustorien zeitlich um 2 Tage versetzt. Unter diesen Bedingungen ist es kaum möglich, Pflanzenmaterial mit Haustorien eines übereinstimmenden Entwicklungsstadiums zu erhalten, was aber für einige Fragestellungen außerordentlich wichtig war.

Beim „parallelen Induktionsmodus“ wird durch Fixieren der *Cuscuta*-Achse mit Klebeband an einer Flanke des Blattstiels zum gleichen Zeitpunkt ein Kontaktreiz über den gesamten haustorienbildenden Achsenbereich des Parasiten ausgeübt. Dadurch wird erreicht, daß sich alle in das Wirtsgewebe eindringenden Haustorien annähernd simultan entwickeln.

Durch Begasen der Wirtsspreite mit  $^{14}\text{CO}_2$  und Ermittlung der Translokationsraten und Verteilungsmuster der radioaktiv markierten Assimilate konnte gezeigt werden, daß es beim „parallelen“ Induktionsmodus schneller zur Entwicklung des Phloemanschlusses kommt, die Translokationsrate erreicht schon 10 Tage nach dem Ansetzen des Parasiten 60%, während beim „gewundenen“ Induktionsmodus dieser Wert durchschnittlich erst nach 14 Tagen erreicht wird (Abb. 3.2).

Die Unterschiede in der Größe der Translokationsrate zwischen 10. und 12. Infektionstag sind auf die unterschiedliche Geschwindigkeit in der Ausbildung der Haustorien bei den beiden Induktionsmodi zurückzuführen. Ab dem 14. Infektionstag stimmen Translokationsraten und in den Parasiten transportierte Anteile bei beiden Modi weitgehend überein.

Die sprunghafte Erhöhung der Translokationsrate stellt einen guten Indikator für einen erfolgreichen Anschluß des Parasiten an die Wirtspflanze dar. Nach unseren Ergebnissen kann davon ausgegangen werden, daß bei Verwenden von 16 Tage alten Wirt-Parasit-Systemen von *Pelargonium zonale-Cuscuta reflexa*, die außerdem einen täglichen Längenzuwachs des Parasiten von mehr als 8 cm aufwiesen, der Kontakt zum Wirtsploem durch die Hyphenzellen hergestellt war.

Es konnte gezeigt werden, daß für Translokationsuntersuchungen im Wirt-Parasit-System *Pelargonium-Cuscuta* drei annähernd gleichwertige Methoden zur Applikation radioaktiv markierter Substanzen an den Wirt zur Verfügung stehen – Begasen der Wirtsblattspreite mit  $^{14}\text{CO}_2$ , Auftropfen von markierten Substanzen auf die Wirtsblattspreite und Injizieren markierter Substanzen in das Parenchym des Wirtblattstieles unterhalb der Blattspreite. Den natürlichen Bedingungen am besten entspricht das Begasen mit  $^{14}\text{CO}_2$ . Allerdings erfordert

diese Methode auch den höchsten apparativen Aufwand und konnte nur bei *Pelargonium zonale* verwendet werden. Die Blätter von *Nicotiana benthamiana* sind zu fragil zum Einspannen in die Assimilationskammern, die Spreiten von *Nicotiana tabacum* zu großflächig und ebenfalls sehr empfindlich. Auf Druck reagieren sie mit dem Auftreten von Nekrosen. An diese Pflanzen erfolgte die Applikation von radioaktiv markierter Saccharose durch Auftropfen auf die Blattspreiten.

Nachteil dieser Methode ist die vergleichsweise geringe Aufnahme der aufgetropften Substanzen, abhängig von der Beschaffenheit von Kutikula und Epidermis der betreffenden Pflanze und bedingt durch das Eintrocknen der Lösungen auf der Blattspreite. Letzteres kann durch ständiges Nachfeuchten der Applikationsstelle mit Puffer eingeschränkt werden. Vorteil der Methode sind die leichte Handhabbarkeit und der im Vergleich zu den Begasungsexperimenten wesentlich geringere apparative Aufwand. Für die Experimente mit Fluoreszenzfarbstoffen war sie die einzig mögliche Methode der Applikation. Bei der dritten Applikationsvariante wurden die radioaktiv markierten Substanzen in einem gepuffertem Medium direkt in das Parenchym des Blattstiel injiziert. Nach Untersuchungen von ROTHE (1994) und GRIMM et al. (1995) erfolgt aus dem Parenchym eine Beladung der Verbindungen in das Phloem und ein anschließender Transport zu den „sinks“.

Trotz der methodischen Unterschiede zwischen den drei Varianten und der dadurch bedingten unterschiedlich großen aufgenommenen Mengen konnten bei allen Applikationsmethoden nach 3 Stunden stets über 60% der vom Applikationsort austransportierten radioaktiv markierten Verbindungen im Parasiten nachgewiesen werden. Bei Begasung mit  $^{14}\text{CO}_2$  lagen  $86,6 \pm 2,9\%$  (Tab. 4.3); nach Auftropfen von  $^{14}\text{C}$ -Saccharose  $69,4 \pm 5,8\%$  (Tab. 3.3) und Injektion von  $^{14}\text{C}$ -Saccharose  $66,9 \pm 3,1\%$  (Tab. 3.8) in *Cuscuta* vor. Für das Wirt-Parasit-System *Vicia faba-Cuscuta reflexa* konnten mehrere Autoren zeigen, daß nach einer Translokationszeit von drei bzw. sechs Stunden mehr als 60% der aus dem Fütterungsort austransportierten radioaktiv markierten Substanzen in den Parasiten gelangen. So fanden JACOB und NEUMANN (1968) sechs Stunden nach Auftropfen von  $^{14}\text{C}$ -Saccharose auf die Blattspreiten von *Vicia faba* 74,6% der austransportierten radioaktiv markierten Verbindungen in der *Cuscuta*, bei einem analog durchgeführten Versuch von STROBEL (1970) konnten nach 6 Stunden zwischen 88,9 und 96,8% im Parasiten gemessen werden.

Diese Werte sagen nichts aus über die absoluten Mengen. Diese sind, bedingt durch die unterschiedliche Größe der Aufnahme, bei den einzelnen Methoden sehr unterschiedlich. Die prozentuale Verteilung der Verbindungen auf die einzelnen Abschnitte des Wirt-Parasit-Systems wird jedoch bestimmt durch die in dem System vorliegenden „source-sink“-Beziehungen und ist offensichtlich unabhängig von den absolut vorliegenden Mengen.

Für die Extraktion des Pflanzenmaterials zur Radioaktivitätsbestimmung mittels Flüssigszintillation wurde, wenn keine Fraktionierung über Ionenaustauscher vorgenommen werden sollte, Methanol bei Raumtemperatur verwendet. Gegenüber anderen gebräuchlichen Methoden, wie dem Kochen in Wasser (DELROT et al., 1983) oder dem Extrahieren in 80% Ethanol bei Raumtemperatur oder bei 60°C im Wasserbad (BUYSSE & MERCKX, 1993) bietet die Extraktion in Methanol bei Raumtemperatur den Vorteil, daß die Proben direkt für die Flüssigszintillationsmessung eingesetzt werden können, wobei das zerkleinerte Pflanzenmaterial im Extraktionsröhrchen verbleibt. Werden die Proben mechanisch zerkleinert, kann bei den Messungen auch der Anteil der bereits fest eingebauten radioaktiv markierten Substanzen erfaßt werden (NEUMANN, 1982).

## 5.2 Zur sink Stärke von *Cuscuta*

Die Fähigkeit eines sinks, Assimilate von source-Regionen zu beziehen, hängt im Wesentlichen von seiner Größe und seiner Aktivität ab, wobei unter der Größe das Gesamtgewicht des sink-Gewebes, unter der Aktivität die Geschwindigkeit der Assimilataufnahme pro Gewichtseinheit des sinks verstanden werden.

Eine Veränderung der sink-Stärke durch Veränderung einer dieser Größen hat Einfluß auf die in einen sink transportierte Assimilatmenge (JEUFFROY & WAREMBOURG, 1991). Innerhalb einer Pflanze wird die Assimilatverteilung bestimmt durch die Konkurrenz zwischen den für ein definiertes Entwicklungsstadium charakteristischen vegetativen und generativen sinks.

Bei den von uns als Wirt benutzten isolierten Blattstielen von *Pelargonium* bildet die Blattspreite den source, das EDTA-haltige Medium, in das das untere Ende des Blattstiels eintaucht, den sink. Die „sink-Stärke“ in diesem System ist außerordentlich gering, meßbar auch an den geringen Translokationsraten, reicht aber aus, um über mehrere Tage einen schwachen Phloemstrom aufrecht zu erhalten (Abb. 3.1). Mit zunehmender Versuchsdauer konnte auch ein zunehmender Assimilattransport in die unteren Blattstielabschnitte und in das Medium gemessen werden. Eine Parasitierung mit *Cuscuta reflexa* im mittleren Blattstielabschnitt führte zu einer deutlichen Zunahme der aus dem Blatt austransportierten Assimilate. Während nicht parasitierte isolierte Blätter von *Pelargonium zonale* 3 Stunden nach Pulsbegasen der Spreite mit  $^{14}\text{CO}_2$  eine Translokationsrate von 14,2% aufwiesen, lag diese bei parasitierten Blättern über 65%.

Aussagen darüber, ob durch die Parasitierung auch die Photosyntheserate des Wirtes erhöht wird, wie das von JESCHKE et. al (1997) für *Ricinus communis-Cuscuta reflexa* gezeigt wurde, sind bei unserer Versuchsanstellung nicht möglich.

Von den austransportierten  $^{14}\text{C}$ -Assimilaten gelangt der Hauptteil, bei einer Versuchsdauer von 3 Stunden bereits zwischen 60 und 80%, in den Parasiten, gleichzeitig nimmt der Transport in den unterhalb der Parasitierung gelegenen Blattstielabschnitt ab. *Cuscuta* ist in diesem System der dominierende sink. Der Parasit zeigt nach erfolgreichem Anschluß ein enormes Wachstum von bis zu 8 cm am Tag, verfügt also auch über eine beträchtliche sink-Größe. Zellteilungs- und Wachstumsprozesse finden in den apikalen 7 cm des Sprosses statt, wobei der erste unmittelbar an der Spitze gelegene Abschnitt von 1cm die größte Wachstumsintensität aufweist (Schulz 2000, Birschwilks 2000). Die Spitzenregion stellt innerhalb der *Cuscuta* Achse auch den dominierenden sink dar.

Überraschenderweise führte eine Reduktion der sink-Größe durch schrittweise Verkürzung von *Cuscuta* nicht in gleichem Umfang zu einer Abnahme der Translokationsrate und des in den Parasiten transportierten Anteils an Assimilaten (Tab. 4.2; Abb. 3.2).

So lag die Translokationsrate selbst bei Reduktion des Parasiten bis auf die im Wirtsblattstiel befindlichen Haustorien nach dreistündiger Translokationszeit bei  $46,2 \pm 8,5\%$  und damit um nahezu 30% höher als in nicht parasitierten Blattstielen. Wurden dem Parasiten nur die freie Sproßachse einschließlich der kontaktreizbaren und besonders intensiv wachsenden Spitzenregion entfernt, war der Unterschied in den Translokationsraten zum intaktem W-P-S noch geringfügiger. Bei einer Translokationszeit von drei Stunden betrug die Translokationsrate im intakten W-P-S  $69,9 \pm 11,4\%$ , im W-P-S mit einer auf die haustorientragende Achse reduzierten *Cuscuta*  $53,5 \pm 1,3\%$ . Verlängert man die Translokationszeit, verringern sich die Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsansätzen. Nach 72 Stunden betrugen die Translokationsraten für das intakte W-P-S  $95,5 \pm 1,2\%$ ; beim System mit dem auf die haustorientragende Achse reduzierten Parasiten  $79,6 \pm 7,6\%$  und bei der Reduktion der *Cuscuta* auf die im Wirtsblattstiel befindlichen Haustorien  $87,9 \pm 2,6\%$ .

Obwohl die Werte sich nur auf die durch die Pulsmarkierung gebildeten  $^{14}\text{C}$ -Assimilate beziehen und auch nichts aussagen über die absoluten Mengen, so zeigen sie doch deutlich, daß *Cuscuta* trotz der Reduktion innerhalb des Systems der dominierende sink bleibt. Die Verteilungsmuster der über das Phloem transportierten Substanzen sind unabhängig von der im Blatt vorliegenden absoluten Menge und werden allein durch die source-sink Beziehungen bestimmt (Neumann, 1982). Die Ergebnisse zeigen aber auch, daß die wachsende Spitze des Parasiten als sink die Verteilung innerhalb der *Cuscuta*-Achse beeinflusst, für den Übertritt von Assimilaten aus dem Wirt in den Parasiten aber spielt sie nicht die entscheidende Rolle. Diese ist vielmehr den Haustorien und den an der Kontaktstelle zwischen Wirt und Parasit ablaufenden Prozessen zuzuordnen.

Der Übergang von Substanzen zwischen Wirt und Parasit spielt sich offensichtlich lokal sehr begrenzt an der unmittelbaren Kontaktstelle zwischen dem Phloem des Wirtes und den

Haustorien ab. In den mit dem Phosphorimager ausgewerteten Längsschnitten war die stärkste Markierung an diesen Stellen nachzuweisen, das zwischen zwei Haustorien liegende nicht parasitierte Leitgewebe war nur sehr gering oder überhaupt nicht markiert (Abb. 3.4).

Nach Begasung des Wirtsblattes mit  $^{14}\text{CO}_2$  lagen in allen Abschnitten des Wirt-Parasit-Systems radioaktiv markierte Zucker, Aminosäuren, organische Säuren, im Blattstiel und im Parasiten auch radioaktiv markierte Stärke vor, wobei zu allen Versuchszeiten Unterschiede im Anteil der einzelnen Fraktionen an der Gesamtradioaktivität eines Abschnittes zu beobachten waren. In *Cuscuta* besaßen die Zucker zu allen Versuchszeiten den größten Anteil. Da der Parasit während der gesamten Zeit weiterhin mit radioaktiv markierten Assimilaten aus dem Wirt versorgt wurde, ist es schwierig, aus diesen Experimenten Aussagen zur Herkunft der im Parasiten vorliegenden Aminosäuren und organischen Säuren zu treffen. Die Frage, ob diese aus dem Wirt stammen oder im Parasiten selbst gebildet werden, könnte nur mit Hilfe weiterführender Versuche, in denen der Parasit nach definierter Translokationszeit vom Wirt abgetrennt und anschließend nach verschiedenen Zeiten aufgearbeitet wird, geklärt werden. Es gibt Hinweise, daß *Cuscuta reflexa* in der Lage ist, bestimmte Aminosäuren selber zu synthetisieren (STROBEL, 1970; FER, 1981).

Eine dünnschichtchromatographische Aufarbeitung der methanollöslichen Zuckerfraktion bestätigte, daß Saccharose sowohl im Wirt als auch im Parasiten die Haupttransportform der Kohlenhydrate darstellt (Abb. 3.7). Sowohl im haustorienbildenden als auch im freien Achsenabschnitt lagen bei Translokationszeiten zwischen 3 und 24 Stunden 70 bis 80% der radioaktiv markierten Zucker als Saccharose vor. In der *Cuscuta*-Spitze war der Anteil der Saccharose an der Gesamtradioaktivität der Zuckerfraktion deutlich geringer, er lag zwischen 57,3% nach 3 Stunden und 38,2% nach 24 Stunden. Parallel dazu nahm in diesem Abschnitt der Anteil an den Monosacchariden Glucose und Fructose zu. Entsprechende Ergebnisse erhält man bei Bestimmung des Gesamtkohlenhydratgehaltes in den Achsen (SCHULZ, 2000).

Die Werte stehen in guter Übereinstimmung mit den Untersuchungen zur Aktivität Saccharose-spaltender Enzyme in den einzelnen Abschnitten der *Cuscuta*-Achse. Sowohl für die verschiedenen Invertasen als auch für Saccharose-Synthase wurden im apikalen Bereich die höchsten Aktivitäten gemessen.

Sowohl Invertasen als auch Saccharose-Synthase sind maßgeblich an der Ausprägung der Aktivität eines sinks beteiligt (TYMOWSKA-LALANNE & KREIS, 1998; STURM & TANG, 1999; TANG et al., 1999), wobei den Invertasen vor allem Bedeutung in der Zellteilungs- und Streckungsphase eines sinks zugeschrieben wird, während Saccharose-Synthase eine wichtige Rolle in Polysaccharid-synthetisierenden und -speichernden sinks (QUICK & SCHAFFER, 1996) spielt. In *Cuscuta* findet die Stärkespeicherung vorwiegend im 5 cm von

der Spitze entfernten apikalen Bereich statt. 24 Stunden nach Applikation von  $^{14}\text{C}\text{O}_2$  an das Wirtsblatt betrug das Verhältnis zwischen der löslichen markierten Zuckerfraktion und der markierten Stärke 87,0 : 13,0%, in der haustorienbildenden und in der frei wachsenden Achse dagegen rund 95,0 : 5,0%. Diesen Verhältnissen entspricht auch die für die einzelnen Abschnitte gemessene Aktivität der ADP-Glucose-Pyrophosphorylase. Zu ähnlichen Ergebnissen über die Stärkeverteilung kamen auch SINGH et al. (1968, 1970) bei ihren Untersuchungen zum Kohlenhydratmetabolismus von *Cuscuta reflexa*. Allerdings ist ein direkter Vergleich zwischen ihren und unseren Werten aufgrund unterschiedlicher Definition der einzelnen Abschnitte innerhalb der *Cuscuta*-Achse nur schwer möglich.

### 5.3 Zur Rolle der Invertase während der Infektion und beim Übertritt der Saccharose

In einem von Eschrich (1980) entwickelten Modell wird der zellwandgebundenen Invertase auch eine wichtige Rolle bei der apoplastischen Phloementladung zugeschrieben. Nach der heute allgemein akzeptierten Vorstellung, gestützt durch Untersuchungen an unterschiedlichen Objekten (MINCHIN et al., 1984; MINCHIN & THORPE, 1984; PATRICK, 1990; GRIMM et al., 1990) erfolgt der Efflux von Saccharose aus dem Phloem entlang des path durch Diffusion, getrieben durch den Konzentrationsunterschied zwischen Symplast und Apoplast. Eine Spaltung der Saccharose durch extrazelluläre Invertase würde den Konzentrationsgradienten und damit den Efflux erhöhen sowie eine Rebelastung der Siebröhren verhindern, da die dafür verantwortlichen Carrier in der Membran des Siebröhren-Geleitzellen-Komplexes für Saccharose spezifisch sind. Die Aufnahme der Monosaccharide erfolgt durch entsprechende Carrier in den Zellen des sink-Gewebes in einem Protonen-Cotransport. Für frühe Entwicklungsstadien von symplastisch vom mütterlichen Gewebe isolierte Samen von *Vicia faba* wurde eine positive Korrelation zwischen Invertaseaktivität der Samenschale, Hexosekonzentration im Apoplasten und Hexosetransportern im Embryo gefunden (WEBER et al., 1995, 1997). Auch Untersuchungen der Entladungsprozesse in Maiskaryopsen (MILLER & CHOUREY, 1992), in Karottenwurzeln (TANG et al., 1999) und in Tomatenfrüchten (DAMON et al., 1988; RUAN et al., 1996) stützen dieses Modell.

Unsere Untersuchungen gaben keinen Anhaltspunkt über eine Beteiligung von Invertase am Transfer von Saccharose zwischen *Pelargonium zonale* und *Cuscuta reflexa*. Im Gegensatz zu den Arbeiten von WOLSWINKEL (1976) und STROBEL et al. (1969) am Wirt-Parasit-System *Vicia faba* - *Cuscuta reflexa* konnte in den von uns untersuchten funktionellen 16 Tage alten Wirt-Parasit-Systemen keine signifikante Erhöhung der Aktivität der apoplastischen sauren Invertase in den parasitierten Blattstielabschnitten gegenüber benachbarten nicht

parasitierten Bereichen gemessen werden (Tab. 3.4). Die von Wolswinkel und auch von uns benutzte Methode der *in vivo* Aktivitätsbestimmung liefert jedoch keine genauen enzymologischen Daten und weist auch einige unvermeidbare Fehlerquellen auf. Nach ihr erfolgt die Charakterisierung der Enzymaktivität durch die quantitative Bestimmung der im Apoplasten aus exogen angebotener Saccharose gebildeten Glucose. Voraussetzung für eine exakte quantitative Bestimmung ist, daß vor der Inkubation die Zucker vollständig aus dem Apoplasten ausgewaschen werden und die Konzentrationen im Apoplast und im Außenmedium während des Experiments im Gleichgewicht stehen. Das soll durch das Zerschneiden des Pflanzenmaterials in dünne Scheiben erreicht werden. Die damit verbundene Verwundung kann aber zu einer Erhöhung der Invertase-Aktivität führen (STURM & CHRISPEELS, 1990). Ferner muß bedacht werden, daß die Glucosekonzentration im Apoplasten auch durch die Aufnahme von Saccharose und Glucose durch die Gewebe beeinflusst werden kann. Eine weitere methodische Unsicherheit besteht in der Gefahr einer Infektion des Versuchsansatzes mit Saccharosespaltenden Mikroorganismen, die sich auf dem Pflanzenmaterial befinden.

Diese methodischen Unsicherheiten fallen bei der *in vitro* Methode der Enzymbestimmung nach WEBER et al. (1996 b) weg, bei der die aus dem Pflanzenmaterial isolierte Zellwand mit Saccharoselösung definierter Konzentration inkubiert wird.

Aufgrund des bei den beiden Methoden verwendeten unterschiedlichen Materials und der sich daraus ergebenden unterschiedlichen Bezugsgrößen sind die bestimmten absoluten Werte für die gebildete Glucose nicht direkt miteinander vergleichbar.

Setzt man jedoch die Enzymaktivität im obersten Abschnitt nicht parasitierter und parasitierter Blattstiele gleich 100% und bezieht die Enzymaktivität der darunter liegenden Abschnitte auf diesen Wert, so ergibt sich ein übereinstimmendes Bild (Abb. 3.8). Sowohl nicht parasitierte als auch parasitierte Blattstiele zeigen dann im obersten Blattstielabschnitt die höchste Invertase-Aktivität. Nach TROLL (1939) gehört *Pelargonium zonale* zu den Pflanzen mit einem apikal im Blattstiel gelegenen Wachstumspunkt. Die hohe Invertase-Aktivität wäre somit im Zusammenhang mit den sich in diesem Abschnitt abspielenden Wachstumsprozessen zu sehen. Bei der oben beschriebenen Art der Berechnung wird auch ganz deutlich sichtbar, daß weder bei der *in vivo* noch bei der *in vitro* Bestimmung ein signifikanter Unterschied in der Enzymaktivität zwischen parasitiertem Blattstiel und Kontrolle festzustellen ist. Gegen eine Beteiligung der extrazellulären Invertase am Transfer der Assimilate spricht auch die Zusammensetzung der radioaktiv markierten Zuckerfraktion nach Applikation von <sup>14</sup>C-Saccharose an den Wirt. Zu allen untersuchten Zeiten lagen im oberen nicht parasitierten und im mittleren parasitierten Blattstielabschnitt vergleichbare Anteile an Saccharose, Glucose und Fructose vor (Abb. 3.7).

Auch während der Ausbildung des Haustorienanschlusses sind keine Veränderungen in dem beschriebenen Muster der Aktivitätsverteilung der extrazellulären Invertase entlang des Blattstiels zu beobachten. In dem von uns untersuchten Zeitraum zwischen 8 und 16 Tagen nach dem Ansetzen des Parasiten wurden die höchsten Aktivitäten immer im oberen Abschnitt des Blattstiels gemessen. Die für den parasitierten Abschnitt gemessenen Werte schwankten zwischen 30 und 40nmol Glucose /mg ZW\*min und unterschieden sich nicht von der Aktivität entsprechender nicht parasitierter Abschnitte (39nmol Glucose / mg ZW\*min). Die Aktivität im oberen Abschnitt war mit 40-70nmol Glucose / mg ZW\*min stets am höchsten im unteren Abschnitt mit 20-25nmol Glucose / mg ZW\*min am niedrigsten (Tab. 4.4).

Entsprechend verhielt sich auch die vakuoläre saure Invertase. Für die lösliche cytoplasmatische Invertase dagegen wurde zwischen dem 10. und dem 14. Tag nach dem Anlegen des Parasiten eine Erhöhung der Enzymaktivität gemessen. Über die Funktion dieses Enzyms ist bisher wenig bekannt (STURM & TANG, 1999). Hohe Aktivitäten der alkalischen Invertase wurden in Saccharose-speichernden Wurzeln von Karotten (RICARDO, 1974; RICARDO & AP REES, 1970) nachgewiesen. Auch Prozesse der Kallusinduktion und der somatischen Embryogenese in Zelluspensionen sind durch hohe Aktivitäten dieses Enzyms gekennzeichnet (SILVA & RICARDO, 1992). Um endgültige Aussagen über die Bedeutung der alkalischen Invertase bei der Haustorienausbildung machen zu können, sind weitere Untersuchungen auch im Zusammenhang mit der Aktivität der Saccharose-Synthase in definierten Stadien der Entwicklung notwendig.

#### 5.4 Selektivität des Übertritts

Bisher gibt es keine Klarheit darüber, in welchem Umfang parasitische Pflanzen in der Lage sind, bei der Aufnahme von Substanzen aus den Leitgeweben des Wirtes eine Selektion vorzunehmen. Außerdem ist unklar, ob die Haustorien aufgrund vorhandener Carrier überhaupt zu einer bevorzugten Aufnahme bestimmter Verbindungen in der Lage sind (PRESS & WHITTAKER, 1993; WANEK & RICHTER, 1993). Einige Ergebnisse, wie die Akkumulation wirtsspezifischer Polyole in *Viscum album* (RICHTER & POPP, 1992), sprechen gegen eine Selektion, während andere Arbeiten, die zeigen, daß im Substanzspektrum zwischen parasitärem und Wirtsgewebe qualitative und quantitative Unterschiede bestehen, auf eine Selektivität bei der Aufnahme durch die Haustorien hindeuten (JESCHKE & HILPERT, 1997). Auch für *Cuscuta reflexa* sind die vorliegenden Daten widersprüchlich.

Die Ergebnisse aus Untersuchungen zur Beeinflussung des Stofftransfers zwischen Wirt und Parasit durch Hemmstoffe veranlaßten WOLSWINKEL (1978) und WOLSWINKEL et al. (1984) zu

der Annahme, daß die Entladung aus dem Phloem des Wirtes an der Kontaktstelle unter metabolischer Kontrolle erfolgt und einen hochspezifischen Prozeß darstellt, was dazu führt, daß einige Substanzen bevorzugt vom Parasiten aufgenommen werden. Diese Vorstellung wird auch durch Arbeiten von JESCHKE et al. (1994 a, b) gestützt, bei denen Unterschiede im Verhältnis von N zu C innerhalb des Wirt-Parasit-Systems *Lupinus albus* -*Cuscuta reflexa* festgestellt wurden.

Daneben gibt es aber eine ganze Reihe von Arbeiten, deren Ergebnisse gegen einen selektiven Stofftransfer sprechen. So konnte STROBEL (1967) bei Wachstum von *Cuscuta reflexa* auf *Albizzia lophanta* und *Canavalia ensiformis* die wirtsspezifischen Verbindungen Pipecolinsäure, OH-Pipecolinsäure und Canavanin auch im Parasiten nachweisen. BÄUMEL et al. (1995) sowie ROTHE et al. (1999) zeigten, daß auch für den Parasiten nicht verwertbare Substanzen aus dem Sekundärstoffwechsel des Wirtes, wie Quinolizidin-Alkaloide und Cardenolide in großen Mengen dem Wirt entzogen werden. Gegen einen selektiven Stofftransfer spricht auch der Übertritt von an die Wirtspflanze applizierten xenobiotischen Verbindungen wie z.B. Wirkstoffe von Pflanzenschutzmitteln, die zu einer Schädigung des Parasiten führen können (JAHNKE, 1975; BIGALKE, 1974; HAUPT & NEUMANN, 1996).

Die von uns in Translokationsversuchen eingesetzten Substanzen umfassen ein breites Spektrum biotischer und xenobiotischer Substanzen mit ganz unterschiedlichen physikochemischen Eigenschaften. Für alle konnten wir nachweisen, daß nach dreistündiger Translokation stets ein Prozentsatz zwischen von 60 – 70% in den Parasiten gelangt (Tab. 3.8). Um eine Beeinflussung des Phloemstromes, besonders durch die Wirkstoffe der Pflanzenschutzmittel, zu kontrollieren, wurden die zu testenden Verbindungen in einer Versuchsreihe simultan mit Saccharose an den Wirt appliziert. Damit ergab sich zusätzlich die Möglichkeit, den Umfang des Transportes von jeweils zwei Verbindungen in der gleichen Pflanze und unter gleichen Bedingungen zu untersuchen. Trotz ihrer unterschiedlichen physikochemischen und physiologischen Eigenschaften fanden wir in allen Experimenten übereinstimmende Anteile an radioaktiv markierter Saccharose und der jeweiligen simultan applizierten Substanz im Parasiten wieder.

Auch bei gleichzeitiger Applikation von zwei xenobiotischen Substanzen, der nicht proteinogenen  $^3\text{H}$ - $\alpha$ -Aminoisobuttersäure und dem Wirkstoff  $^{14}\text{C}$ -MCPA, wurden für beide Substanzen übereinstimmende Anteile,  $71,4 \pm 11,6\%$  bzw.  $72,5 \pm 4,5\%$ , im Parasiten gemessen (Abb.3.14). Mit diesem Versuch konnte gezeigt werden, daß auch zwei, dem pflanzlichen Stoffwechsel vollkommen fremde Substanzen, die nicht wie Saccharose schon in großen Mengen unmarkiert in der Pflanze vorliegen, einem hohen Stoffwechselumsatz unterliegen und damit die Genauigkeit der errechneten Werte beeinflussen könnten, zu gleichen Anteilen in den Parasiten übertreten. Diese Ergebnisse sprechen ganz deutlich für

einen nicht selektiven Stofftransfer zwischen Wirt und Parasit, alle im Phloem des Wirtes transportierten Substanzen gelangen auch in den Parasiten.

Bisher wird ein apoplastischer Übertritt für den Transfer von Assimilaten aus dem Wirt in den Parasiten *Cuscuta* angenommen, der als zweistufiger Prozeß ablaufen soll. Im ersten Schritt soll eine Freisetzung der Assimilate aus der Wirtssiebröhre in den umgebenden Apoplasten erfolgen, aus dem sie in einem zweiten Schritt von den hochdifferenzierten Hyphenzellen des Parasiten über spezifische Carrier aufgenommen werden. Der erste Schritt setzt keine Auflösungen in den Membranen der Wirtssiebröhren voraus.

WOLSWINKEL (1977) sieht im Assimilatübertritt vom Wirt in den Parasiten Parallelen zum Transport zwischen der Samenschale und dem symplastisch isolierten Embryo in sich entwickelnden Leguminosensamen.

Er schloß aus seinen Effluxuntersuchungen an mit *Cuscuta europaea*, *C. campestris* und *C. lupuliformis* parasitierten Achsen von *Vicia faba*, daß die Entladung der Siebröhre durch spezifische Carrier erfolgt und metabolisch kontrolliert wird (WOLSWINKEL, 1977). Entgegen gebräuchlicher Auswaschzeiten von wenigen Minuten zur Erfassung der Substanzen im freien Raum (GRIMM et al., 1990, ROTHE 1994) wurde von WOLSWINKEL (1976) über mehrere Stunden ausgewaschen, so daß angenommen werden muß, daß in seinen Experimenten neben den im Apoplasten befindlichen auch aus dem Symplasten nachströmende Substanzen erfaßt wurden.

Unsere Ergebnisse, bei denen für alle untersuchten Verbindungen stets übereinstimmende Anteile im Parasiten nachgewiesen wurden, lassen sich mit dem Modell des apoplastischen Transports mit zwei Membranpassagen nicht vereinbaren.

Eine wesentliche Voraussetzung für einen funktionierenden Phloemstrom nach der Druckstromtheorie von MÜNCH (1930), die bis heute noch ihre Gültigkeit besitzt, besteht in der Retention der transportierten Verbindungen entlang des path (KEMPERS et al., 1998).

Das wird für Saccharose und xenobiotische Verbindungen auf unterschiedliche Weise erreicht. Saccharose, die aufgrund des Konzentrationsgradienten zwischen Siebröhren-Geleitzellen-Komplex und Apoplast entlang des path durch die Membranen in den Apoplasten diffundiert, wird durch spezifische Carrier aktiv in das Phloem zurückgepumpt („leak and pump“-Mechanismus nach BAKER, 1978; MINCHIN & THORPE, 1984). Bei einer apoplastischen Entladung könnte dieser Rücktransport in die Siebröhre gestört sein, indem Saccharose von den umgebenden sink-Zellen sehr schnell aufgenommen oder aber durch eine apoplastische Invertase gespalten wird.

Die Retention der von uns untersuchten xenobiotischen Verbindungen im Phloem erfolgt nach unterschiedlichen Mechanismen, für 2,4-D und MCPA durch das Prinzip einer Ionenfalle (Neumann et al., 1985). Die Verbindungen liegen beim pH-Wert des Phloemsafte von 7,2-8,7 (ZIEGLER, 1975) fast vollständig als hydrophile Ionen mit sehr kleinen

Verteilungskoeffizienten ( $\log K_{ow}$ ) vor. Die Retention für das sowohl bei pH 5 als auch bei pH 8 sehr hydrophile Glyphosat mit Verteilungskoeffizienten im System Octanol-Wasser von  $\log K_{ow} = -0,92$  (NEUMANN et al., 1985) erfolgt nach einem intermediate-permeability-Mechanismus (Tyree et al., 1979). Entsprechend ihres unterschiedlichen Retentionsmechanismus erfordert auch der Austritt der Verbindungen aus der Siebröhre unterschiedliche Mechanismen. Für 2,4-D und MCPA könnte er durch eine lokale Erhöhung des pH-Wertes an der Kontaktstelle und einer dadurch bedingten Verschiebung des Verhältnisses zwischen dissoziierten und undissoziierten Anteilen möglich sein. Für eine Veränderung des pH-Wertes im Apoplasten unter dem Einfluß der Parasitierung gibt es aber bisher keine Anhaltspunkte. Der Efflux von Glyphosat würde jedoch durch eine pH-Änderung nicht beeinflusst werden.

Damit die unterschiedlichen Substanzen in den von Parasit und Wirt gemeinsam gebildeten Apoplasten gelangen können, ist es daher notwendig, daß es am Plasmalemma der Wirtssiebröhre zu einer unspezifischen Erhöhung der Permeabilität kommt oder Poren gebildet werden.

Auch für den zweiten Schritt des apoplastischen Übertritts, die Aufnahme in die Absorptionshyphe des Parasiten, sind für die untersuchten Substanzen unterschiedliche Mechanismen anzunehmen. Für Saccharose, die proteinogenen und vielleicht auch für die nicht proteinogene Aminosäure  $\alpha$ -AIB ist eine carriervermittelte Aufnahme vorstellbar. Für die Xenobiotika erfolgt die Aufnahme, da spezifische Carrier fehlen, nach bisherigen Kenntnissen durch Diffusion. Für Glyphosat wird zwar ein über einen Phosphat-Carrier vermittelter Transport diskutiert (ANTHELME & MARIGO, 1998), ist allerdings bisher noch nicht endgültig bewiesen.

Die unterschiedlichen Aufnahmemechanismen müßten auf jeden Fall zu Unterschieden in den im Parasiten vorliegenden Mengen führen. Das bestätigen auch unsere Aufnahmeversuche mit ausgestanzten Scheiben von *Ricinus*-Keimblättern, bei denen Saccharose gemeinsam mit MCPA, 2,4-D oder Glyphosat appliziert wurde (Tab. 3.9). Hier konnten signifikanten Unterschiede im Verhältnis zwischen Saccharose und dem jeweiligen Xenobiotikum in der Fütterungslösung und im *Ricinus*gewebe nach der Aufnahme festgestellt werden.

Bei gleichzeitiger Applikation von Saccharose und Glyphosat ist das Verhältnis im Gewebe im Vergleich zu dem in der Fütterungslösung zugunsten der Saccharose, bei gleichzeitiger Applikation von Saccharose und den Phenoxyssäuren zugunsten der Xenobiotika verschoben. Für letztere erfolgt offensichtlich im Anschluß an die Aufnahme durch Dissoziation eine umfangreiche Speicherung im Gewebe. Die Ergebnisse bestätigen die von GRIMM et al. (1995) ermittelten unterschiedlich großen Permeationskonstanten für die

Aufnahme von Saccharose, 2,4-D, MCPA und Glyphosat in isolierte Leitbündel von *Cyclamen persicum*.

In unseren Versuchen wurden jedoch stets übereinstimmende Anteile an transportierten Substanzen im Parasiten gemessen, auch konnten keine signifikanten Unterschiede im Verhältnis der beiden gemeinsam applizierten Verbindungen zwischen dem mittleren Blattstielabschnitt von *Pelargonium* und der Achse von *Cuscuta* festgestellt werden (Tab. 3.10).

Unsere Ergebnisse sprechen ganz deutlich gegen einen apoplastischen Transfer mit zwei Membranpassagen und lassen eine symplastische Verbindung zwischen Wirt und Parasit an der Kontaktstelle vermuten.

## 5.5 Viren

Das bisher wichtigste Argument für einen apoplastischen Übertritt von Assimilaten zwischen Wirtspflanze und *Cuscuta* besteht darin, daß es bisher nicht möglich war, durch elektronenmikroskopische Untersuchungen Plasmodiesmen an der Kontaktstelle zwischen Wirtssiebröhre und parasitärer Hyphenzelle (Dörr, 1972) nachzuweisen. In der Literatur gibt es jedoch seit langem Hinweise auf eine symplastische Verbindung zwischen Wirt und Parasit.

So werden schon seit vielen Jahren *Cuscuta*-Arten benutzt, um Viren (BENNETT, 1940; 1956; ESAU, 1948; HOSFORD, 1967; KUIJT, 1969, MARCONE et al., 1999) und mycoplasmenartige Organismen (MLO) zwischen Pflanzen verschiedener oder gleicher Species zu übertragen (HEINTZ, 1989; ROOS und ALDRICH, 1988). Da *Cuscuta*-Arten ein breites Wirtsspektrum besitzen und eine einzelne Pflanze in der Lage ist, unterschiedliche Wirtspflanzen zu infizieren, wird *Cuscuta* bei der Übertragung als „lebende Brücke“ verwendet. Die Technik wird vor allem benutzt, um Wirtsspezifitäten von Viren und MLOs zu bestimmen. Dabei sind nicht alle *Cuscuta*-Arten für alle Viren und MLOs gleich gute Überträger. Bei der Erfolgsrate der Übertragung kommt es sehr auf die Kombination von *Cuscuta*-Species und Virus an (SCHMELZER, 1958).

Für das Kartoffelvirus X, welches auch von *Cuscuta* übertragen werden kann (SCHMELZER, 1958), konnten ROBERTS et al. (1997) durch Einfügen des green fluorescent protein (GFP) in das Virusgenom einen Transport von Zelle zu Zelle ausschließlich über Plasmodiesmen und einen Langstreckentransport im Phloem des Wirtes mittels Konfokalem Laser Scanning Mikroskop zeigen. Dabei werden die Viren zusammen mit den Assimilaten im „source“ in die Siebröhren beladen und auf symplastischem Wege in die sinks entladen.

In unseren Experimenten gelang es durch Verbinden einer virusinfizierten und einer virusfreien Tabakpflanze über eine *Cuscuta*-Brücke das Kartoffelvirus X.GFP (PVX.GFP) auf gesunde Pflanzen zu übertragen. Der Übertritt des PVX.GFP konnte mittels molekularbiologischer Methoden nachgewiesen werden. In den „sink“-Blättern der zweiten Tabakpflanze traten sowohl Virusproteine als auch Virus-RNA auf (Abb. 3.21). Da PVX.GFP ein rein symplastisch wanderndes Virus ist, kann daraus geschlußfolgert werden, daß sowohl an der Kontaktstelle zwischen Wirtspfloem und Absorptionshyphe des Parasiten in der ersten Pflanze als auch zwischen den wachsenden Hyphenspitzen und den Parenchymzellen der zweiten Pflanze eine symplastische Verbindung bestehen muß. Ein Transport von PVX.GFP zwischen zwei Zellen über den Apoplasten scheint nach bisherigen Untersuchungen ausgeschlossen. In Experimenten von DING et al. (1998) waren die symplastisch isolierten Geleitzellen in Blättern von *Phaseolus vulgaris* und *Pisum sativum*, zwei Pflanzen mit apoplastischer Beladung, von einer Virusinfektion ausgenommen. Wegen fehlender Plasmodesmen fand in sie kein Transport von Viren aus den angrenzenden Parenchymzellen statt.

Der Übertritt der Viren aus dem Phloem des Parasiten in die zweite *Cuscuta*-Pflanze kann während der Haustorienentwicklung erfolgen. Während der Ausdifferenzierung des Haustoriums verhält sich das entwickelnde Haustorium gegenüber der *Cuscuta*-Achse, aus der es hervorgeht, für einen kurzen Zeitraum als „sink“ und es findet ein umfangreicher Assimilattransport in das Haustorium statt (DAWSON et al., 1994). Zu diesem Zeitpunkt werden an den Haustorien Suchhyphen ausgebildet, welche vorübergehend durch Plasmodesmen mit den sie umgebenden Wirtszellen symplastisch verbunden sind (Dörr, 1969). Dadurch besteht für Viren eine kurzzeitige Möglichkeit, symplastisch in das Gewebe einer neuen Wirtspflanze einzudringen.

Leider konnten bei allen untersuchten Wirt-Parasit-Virus-Systemen im Parasiten keine GFP-exprimierenden Viren (PVX.GFP) mittels Konfokaler Laser Scanning Mikroskopie nachgewiesen werden, da PVX.GFP sich in *Cuscuta* nicht oder in nur sehr geringem Umfange vermehrt (Abb. 3.20). Wahrscheinlich war die Konzentration des GFPs im parasitären Gewebe zu gering, um im Konfokalen Laser Scanning Mikroskop gesehen zu werden. Da zwischen Inokulation der Wirtspflanze mit PVX.GFP und der Ausbildung des Phloemkontaktes zwischen Wirt und *Cuscuta* ein Zeitraum von mehreren Tagen lag, traten neben dem PVX.GFP auch durch rekombinante Ereignisse entstandene nicht fluoreszierende Genomformen auf. Diese nicht fluoreszierenden Genomformen replizieren sich erfolgreicher als das modifizierte Virus und beginnen auch schneller mit einer systemischen Infektion der Wirtspflanze (ROBERTS et al., 1997).

Leider konnte der Zeitraum zwischen Parasitierung mit *Cuscuta* und Inokulieren der Wirtspflanze mit PVX.GFP nicht auf mehr als 7 Tage ausgedehnt werden, da da sonst die Wirtspflanze den doppelten Belastungen erlag.

## 5.6 Fluoreszenzfarbstoffe

1933 wurde erstmals von SCHUMACHER über die Verwendung eines Farbstoffes berichtet, „der durch kurzweilige Bestrahlung innerhalb der lebenden Zelle zum Leuchten“ gebracht werden kann und damit „die Beobachtung des Wanderungsvorganges eines organischen Körpers in den spezifischen Leitbahnen der Pflanze“ ermöglicht. Es handelte sich um Fluorescein. Ein Jahr später benutzte SCHUMACHER (1934) diesen Fluoreszenzfarbstoff um zu zeigen, daß Substanzen in den Siebröhren der Wirtspflanze *Pelargonium zonale* wandern und über das Haustorium in den Parasiten *Cuscuta odorata* eintreten. Er beobachtete auch, daß der Farbstoff mit hoher Geschwindigkeit in die Siebröhren des Parasitenstromes weitergeleitet wurde ohne das „Plasma“ zu verlassen. SOCOLAR und LOEWENSTEIN (1979) wiesen jedoch nach, daß Fluorescein aufgrund seiner pKa-Werte von 4,4 und 6,7 (MARTIN & LINDQUIST 1975) im physiologischen pH-Bereich auch zu einem beträchtlichen Teil undissoziiert vorliegen kann und in dieser Form durchaus in der Lage ist, Plasmamembranen zu passieren. GRIGNON et al. (1989) beobachteten während des Transports von Fluorescein im Phloem von *Glycine max.* einen Austritt des Farbstoffes entlang des path in den Apoplasten und einen anschließenden Transport im Xylem. Durch Einführen einer zweiten Carboxylgruppe in Position 5 oder 6 des Benzolringes des Fluoresceinmoleküls ist es möglich, die Hydrophilie der Verbindung zu erhöhen. Das auf diese Weise erhaltene 6(5) Carboxyfluorescein (CF) mit pka-Werten von 3,3; 4,65 und 6,98 (WRIGHT et al., 1996) ist bei den im Symplasten vorliegenden pH-Werten zwischen 6,3 und 7,3 fast vollständig dissoziiert. Nur 0,1–0,01 % liegen als membranpermeable undissoziierte Verbindung vor. Die hydrophilen Anionen sind aufgrund ihrer geringen Hydrophilie nicht in der Lage die Membranen zu passieren, sie verbleiben im Symplasten. Die Verteilungsmuster von CF stimmen vollständig mit dem <sup>14</sup>C-markierter Assimilate überein, so daß die Verbindung sowohl als Marker für einen symplastischen und als auch für den Phloemtransport benutzt werden kann (GRIGNON et al., 1989). Da Carboxyfluorescein auch bei pH 5, dem pH des Apoplasten, zu einem erheblichen Teil dissoziiert vorliegt, ist seine Aufnahme in den Symplasten jedoch gering. Für den mikroskopischen Nachweis müssen aber bestimmte Konzentrationen in den Zellen vorliegen. Diese Schwierigkeiten werden überwunden indem Carboxyfluorescein wird als Diester (Carboxyfluoresceindiacetat, CFDA) appliziert wird. Diese nichtfluoreszierende Verbindung mit einem log K<sub>OW</sub> von 1,3 ist wesentlich lipophiler als

CF (log  $K_{ow}$  -1,9) (WRIGHT et al., 1996) und wird nach Applikation über die Blätter sehr gut durch Diffusion in das Mesophyll aufgenommen. Im Symplasten wird CFDA durch unspezifische Esterasen zunächst zu CF hydrolysiert, das fast vollständig zum hydrophilen zweiwertigen Anion dissoziiert. Dieses gelangt symplastisch durch Plasmodesmen von Zelle zu Zelle bzw. wird nach Beladung in das Phloem mit den Assimilaten zum sink transportiert und dort symplastisch entladen (DUCKETT et al., 1994; OPARKA et al., 1994; WANG & FISHER, 1994; WANG et al., 1994).

In Bereichen mit niedrigem pH (Vakuole, Apoplast) kann die Diffusion des undissoziierten CFs u.U. einen wesentlichen Anteil am interzellulären Transport ausmachen. Auch kann die in einigen Fällen beobachtete schnelle Aufnahme und Speicherung von CF in Vakuolen die Verteilung des Farbstoffes in pflanzlichen Geweben beeinflussen. Es ist aber davon auszugehen, daß symplastisch verbundene Zellen gegenüber stärker isolierten viel weniger CF in der Vakuole zurückzuhalten. Für das CF-Anion sollte auf Grund seiner Hydrophilie die Tonoplastenmembran eigentlich impermeabel sein. Als Ursache für die dennoch beobachtete Speicherung des Farbstoffes in den Vakuolen, welche durch Probenecid inhibiert werden kann, wird ein carrier-vermittelter Transport über einen ABC-Transporter in der Tonoplastenmembran diskutiert (COLE et al., 1991; WRIGHT & OPARKA, 1994).

Heute wird CF hauptsächlich zur Markierung des Assimilatstromes oder zum Nachweis symplastischer Verbindungen zwischen Zellen verwendet. SCHÖNING und KOLLMANN (1995) benutzten den Farbstoff, um durchgehende Phloemverbindungen zwischen Pflanzlingen nachzuweisen. GRIGNON et al. (1989) applizierten CF an Blattspreiten und Blattstiele von Sojabohnen und fanden einen Langstreckentransport im Phloem ohne seitlichen Austritt in den Apoplasten. OPARKA (1991) konnte in Sojabohne nachweisen, daß CF und  $^{14}\text{C}$ -Saccharose nach gleichen Mustern über das Phloem in der Pflanze verteilt werden. KNOBLAUCH und VAN BEL (1998) zeigten, daß in *Vicia faba* der Fluoreszenzfarbstoff passiv gemeinsam mit den Assimilaten im Phloem transportiert und anschließend in sinks entladen wird.

Der zweite von uns benutzte Fluoreszenzfarbstoff HPTS (8-Hydroxypyren-1,3,6-Trisulfonsäure) besitzt 3 Sulfonylgruppen. Für diese wird ein pKa <0,7 angenommen, was bedeutet, daß das Molekül bei physiologischen pH-Werten (6,3– 7,3) stark geladen und damit nicht in der Lage ist, durch Membranen zu diffundieren (STEWART, 1981). Diese Eigenschaft wurde in mehreren Untersuchungen genutzt, um den Apoplasten zu markieren (WANG & FISCHER, 1994). So verwandten PETERSON und EMANUEL (1981) HPTS, um einen durch Sekundärwurzelbildung entstehenden apoplastischen Weg durch die Endodermis der Wurzeln von *Zea mays* und *Vicia faba* zu zeigen.

Nachdem HPTS auch als Ester (8-Acetoxyphenyltrisulfonsäure, HPTSA, HPTS-Acetat) erhältlich ist, wird es auch zunehmend als Phloemmarker eingesetzt (WRIGHT & OPARKA, 1996). Der Mechanismus ist analog dem des CFDA. Der nicht fluoreszierende Ester HPTSA diffundiert in die Zelle und wird dort von einer intrazellulären Esterase gespalten. Sowohl das dabei entstehende stark hydrophile HPTS-Molekül als auch die im alkalischen pH durch Dissoziation gebildeten Anionen sind aufgrund ihrer Hydrophilie nicht in der Lage, durch Membranen zu diffundieren und verbleiben im Symplasten. Die große Hydrophilie des undissoziierten HPTS-Moleküls ( $\log K_{OW} = -10,1$ , WRIGHT et al. 1996) stellt seinen wesentlichen Vorzug gegenüber CF ( $\log K_{OW} = -2,4$ , WRIGHT et al. 1996) dar.

WRIGHT und OPARKA (1996) benutzten HPTS als alternativen phloemmobilen Fluoreszenzfarbstoff zum CF, um symplastische Entladung des Phloems nachzuweisen. Sie konnten an drei Beispielen (Kotyledonen von *Arabidopsis*, Nektarien von *Abutilon pictum* und Karyopsen von *Hordeum vulgare*) für beide Verbindungen, die als Ester appliziert wurden, Übereinstimmungen in der Aufnahme, der Phloembe- und der Phloementladung zeigen.

Bei unseren Translokationsversuchen wurden die Ester HPTSA und CFDA an „source“-Blätter von *Nicotiana benthamiana*-Pflanzen, die am Sproß oder am Blattstiel mit *Cuscuta reflexa* parasitiert waren, appliziert. Da die Entfernungen zwischen dem Ort der Applikation („source“-Blatt des Wirtes) und dem Ort des Übertrittes vom Wirt in den Parasiten mindestens 15 cm betragen, ist es unwahrscheinlich, daß die Ester durch den Apoplasten bis in den Parasiten transportiert werden, ohne durch Esterasen gespalten zu werden. So kann davon ausgegangen werden, daß der Transport von CF und HPTS auf Grund ihrer Eigenschaften von Zelle zu Zelle symplastisch erfolgt.

Wir konnten zeigen, daß beide Farbstoffe aus den Siebröhren des Wirtes in die Hyphenzellen des Parasiten übertreten ohne daß eine Markierung des Apoplasten im Konfokalen Laser Scanning Mikroskop sichtbar wurde (Abb. 3.16-18). Bei nicht parasitierten Leitbündeln konnte in keinem Fall eine Entladung der Farbstoffe in umliegendes Parenchym des Wirtes gesehen werden. Sie fand nur bei Leitbündeln statt, an denen *Cuscuta* über Hyphenzellen einen direkten Kontakt hergestellt hatte. Eine Entladung aus dem Phloem fand erst in den „sink“-Gewebe des Parasiten statt.

Bei den von uns durchgeführten Untersuchungen zur Zeitkinetik des Übertritts von  $^{14}\text{C}$ -Saccharose und CF während der Ausbildung des Leitbündelkontaktes zwischen Wirt und Parasit traten einige signifikante Unterschiede auf (Abb.3.19). Während es bei Applikation von  $^{14}\text{C}$ -Saccharose zu einem allmählichen Anstieg des in den Parasiten transportierten Prozentsatzes an radioaktiv markierten Verbindungen kommt, 4% nach 6 Tagen, 13% nach 8 Tagen, 40% nach 10 Tagen und ab dem 12. Tag nach Ansetzen des Parasiten über 60%, konnte für CF bis zum 10.Tag nach Ansetzen des Parasiten kein Übertritt des Farbstoffes festgestellt werden. Zwar waren die Leitbündel des parasitierten Blattstieles stets markiert,

aber erst mit dem 12. Parasitierungstag war auch ein Übertritt des Fluoreszenzfarbstoffes aus den parasitierten Leitbündeln in die *Cuscuta* sichtbar (Abb. 3.19). Das Ergebnis legt nahe, daß Saccharose im Gegensatz zum CF zu einem Zeitpunkt, wenn noch kein symplastischer Kontakt zwischen den Leitbündeln von Wirt und Parasit hergestellt ist, auch auf apoplastischem Wege in die *Cuscuta* gelangen kann.

## 5.7 Translokation von GFP

In den letzten Jahren wurden im Phloemsaft verschiedener Pflanzen so z. B. in Weizen (FISHER et al., 1992); in Reis (ISHIWATARI et al., 1998); und in *Ricinus communis*, (SCHOBERT et al., 1995) eine Reihe von Proteinen identifiziert, die nach ihrer Synthese in den Geleitzellen durch Plasmodesmen in die Siebröhren gelangen und gemeinsam mit den Assimilaten zu den sink-Regionen transportiert werden. Für einige von ihnen konnte gezeigt werden, daß sie die Fähigkeit besitzen, von Zelle zu Zelle durch Plasmodesmen zu wandern (BALACHANDRAN et al., 1997; GOLECKI et al., 1999; THOMPSON & SCHULZ, 1999). In Propfexperimenten zwischen verschiedenen *Cucurbita* Species konnte ein Transport von artspezifischen Phloem-Proteinen der Unterlage in das Reis nachgewiesen werden.

Mit der Isolierung des Grünen Fluoreszierenden Proteins (GFP) aus der Meeresqualle *Aequorea victoria* (CHALFIE et al., 1994) steht ein Markerprotein zur Verfügung, das in Verbindung mit einem Fluoreszenzmikroskop die Möglichkeit eröffnet, den Transport eines Proteins in lebenden Zellen zu verfolgen.

Der entscheidende methodische Durchbruch für den Einsatz dieses Proteins für Translokationsuntersuchungen im Phloem gelang durch die Herstellung von AtSUC2-Promotor-GFP-Pflanzen, transgenen Pflanzen von *Arabidopsis thaliana* und von *Nicotiana tabacum* cv. Sumsai, die dieses Protein unter Kontrolle des AtSUC2 Promotors in den Geleitzellen synthetisieren (IMLAU et al., 1999). Dieser Promotor reguliert im Wildtyp von *Arabidopsis thaliana* die Genexpression des geleitzellspezifischen AtSUC2 Saccharose-H<sup>+</sup> Symporters, der für die Aufnahme von Saccharose in den Siebröhren-Geleitzellen-Komplex verantwortlich ist. Eine Analyse der AtSUC2- Promotor-GFP-Pflanzen ergab, daß das 27 kDa große GFP in der Lage ist, durch Plasmodesmen von den Geleitzellen in die Siebröhren zu gelangen. Es wird im Phloem gemeinsam mit den Assimilaten in Richtung der „sinks“ transportiert und dort symplastisch entladen (OPARKA et al., 1999). In allen sink-Geweben konnte ein symplastischer post-Phloemtransport von GFP beobachtet werden (Imlau et al., 1999). GFP ist auf Grund seiner Größe von 27 kDa nicht in der Lage, in die Vakuole der Zellen zu diffundieren, kann aber durch die Kernporen in die Zellkerne gelangen.

In transgenen Pflanzen von *Nicotiana tabacum* cv. Sumsai wird das AtSUC2 Gen ausschließlich in den Geleitzellen exprimiert (STADLER & SAUER, 1995). STADLER et al. (1996) konnten in *Plantago major* nachweisen, daß der gleiche Saccharosetransporter (PmSUC2) ebenfalls ausschließlich in Geleitzellen vorkommt.

Propfungsexperimente, bei denen ein Reis vom Wildtyp von *Nicotina tabacum* auf eine transgene Propfunterlage gesetzt wurde, haben gezeigt, daß GFP in das Reis wandert und in sink-Geweben wie jungen Blättern und Blüten entladen wird. Damit liegt ein weiterer Beweis für die Phloemmobilität von GFP vor. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß auch die RNA des GFP wandert. Aber auch diese kann aber nur symplastisch durch Plasmodesmen von Zelle zu Zelle gelangen.

In unseren Experimenten wurden transgene AtSUC2-GFP-*Nicotiana tabacum* – Pflanzen mit *Cuscuta reflexa* parasitiert.

Handschnitte durch die parasitierten Sprosse und Blattstiele von transgenen AtSUC2-GFP-*Nicotiana tabacum* cv. Sumsai zeigten, daß GFP aus den Siebröhren des Wirtes direkt in die Kontakthyphen des Parasiten übertritt und von dort aus im Phloem zu den sinks, den wachsenden Spitzen transportiert wird (Abb. 3.22-23) (HAUPT et al., 2001 a). Während bei den von *Cuscuta*-Haustorien parasitierten Leitbündeln ein Übertritt des GFPs aus dem Wirtsploem in die Haustorien von *Cuscuta* zu sehen ist, war bei den nicht parasitierten lateralen Leitbündeln im gleichen Schnitt kein Austritt des Proteins in umgebendes Wirtsparenchym zu erkennen. In den schnell wachsenden Spitzen der *Cuscuta*-Sprosse (sink-Region innerhalb des Parasiten) konnte eine symplastische Entladung des GFPs in das Parenchym gezeigt werden. Zusammen mit den in der Literatur vorliegenden Ergebnissen zur Translokation von GFP sind diese Beobachtungen einen weiteren Beweis dafür, daß der funktionelle Phloemkontakt zwischen *Cuscuta reflexa* und dem kompatiblen Wirt *Nicotiana tabacum* symplastischer Natur ist.

## 5.8 Unser Modell für den Übertritt

Aus unseren Ergebnissen über die Translokation von Assimilaten, Phytohormonen xenobiotischen organischen Verbindungen unterschiedlichster chemischer Struktur, Fluoreszenzfarbstoffen, Viren und Proteinen kann abgeleitet werden, daß beim Transfer von Substanzen aus dem Phloem des Wirtes in den Parasiten keine Auswahl stattfindet. Es ist vielmehr davon auszugehen, daß alle im Wirtsploem enthaltenen Verbindungen in den Parasiten gelangen, sobald dieser einen funktionellen Anschluß an die Siebröhren des Wirtes hergestellt hat. Obwohl bei umfangreichen elektronenmikroskopischen Untersuchungen der Kontaktstelle zwischen Wirtsploem und Absorptionshyphe des

Parasiten keine Plasmodesmen nachgewiesen werden konnten (DÖRR, 1968, 1969, 1972, 1990), sprechen insbesondere der Transfer der untersuchten Farbstoffe, der Viren und des GFP für eine symplastische Verbindung zwischen Wirt und Parasit. Aus anderen Untersuchungen ist bekannt, daß die als Marker für symplastische Verbindungen benutzen Farbstoffe CF und HPTS sowie GFP nur symplastisch aus dem Phloem entladen werden können. Der Widerspruch zwischen histologischen und physiologischen Befunden könnte darin begründet sein, daß sich die Ergebnisse der ultrastrukturellen Untersuchungen von Dörr auf *Cuscuta odorata* beziehen, unsere physiologischen Untersuchungen aber an *Cuscuta reflexa* durchgeführt wurden. Für *Cuscuta reflexa* liegen bisher keine entsprechenden elektronenmikroskopischen Bilder vor, während für *Cuscuta odorata* physiologische Untersuchungen fehlen. Während unsere Ergebnisse zum Transfer der unterschiedlichen Verbindungen alle an 14-16 Tage alten voll funktionellen Wirt-Parasit-Systemen durchgeführt wurden, finden sich den Arbeiten von Dörr keine Angaben über das Alter des untersuchten Wirt-Parasit-Systems. Es ist denkbar, daß die vorliegenden strukturellen Untersuchungen zu einem Zeitpunkt durchgeführt wurden als die plasmatische Verbindung zwischen Wirt und Parasit noch nicht voll ausgebildet war.

Die im elektronenmikroskopischen Bild sichtbare symplastische Isolierung der Absorptionshyphe des Parasiten bildet die Grundlage für das bisher akzeptierte Modell des apoplastischen Transfers von phloemmobilen Substanzen zwischen Wirt und Parasit. Auch durch unsere Untersuchungen kann zumindest für frühe Entwicklungsstadien des Haustoriums für Assimilate ein solcher Transport nicht ausgeschlossen werden. Nach Pulsmarkierung der Wirtsspreiten mit  $^{14}\text{CO}_2$  wurden zwischen dem 6. und dem 10. Tag nach Ansetzen des Parasiten an den Wirtsblattstiel bereits 10% - 40 % der transportierten Assimilate im Parasiten gefunden, ab dem 12. Tag waren es stets mehr als 60%, der Anstieg der Translokationsrate erfolgte sprunghaft. Dafür, daß zwischen 12 und 14 Tagen die Ausbildung eines symplastischen Kontaktes zwischen Wirt und Parasit erfolgt, spricht auch, daß erste Übertritte für den Fluoreszenzfarbstoff CF in den Parasiten im Gegensatz zu den  $^{14}\text{C}$ -Assimilaten erst nach 12 Tagen gefunden werden, obwohl in den Leitbündeln des Wirtes stets eine Translokation des Farbstoffes von den sources in die wirtseigenen sinks zu beobachten war.

Wenn in dem von uns untersuchten W-P-S *Pelargonium zonale* in frühen Entwicklungsstadien ein apoplastischer Transfer der Assimilate zwischen Wirt und Parasit stattfindet, so scheint daran aber keine Invertase beteiligt zu sein.

Auf der Grundlage unserer Ergebnisse schlagen wir folgendes Modell zum Stoffübertritt von Substanzen aus dem Phloem des Blattstieles von *Pelargonium zonale* in *Cuscuta reflexa* vor. Während der Ausbildung des Haustoriums und des Anschlusses der Hyphenzellen an das Phloem des Wirtes erfolgt der Übertritt der Substanzen in zwei Phasen. Ab dem 4. Tag

nach Ansetzen des Parasiten an einen kompatiblen Wirt bildet *Cuscuta reflexa* an der Spitze des Haustoriums Suchhyphen aus, die durch Plasmodesmen in symplastischem Kontakt zu den Parenchymzellen des Wirtes stehen, die von den Suchhyphen intrazellulär durchwachsen werden können. Ein Haustorium von *Cuscuta reflexa* bildet während der Entwicklung des Phloemkontaktes ungefähr 200 Suchhyphen aus. Ein Teil der Suchhyphen wächst auch interzellulär durch den Apoplasten des Wirtes. Die Wirtspflanze transportiert die in den Spreiten gebildeten Assimilate zu den wirtseigenen sinks durch die Blattstiele (path). Während dieses Transportes kommt es zur Diffusion von Saccharose aus den Wirtssiebröhren. Ein Teil wird aktiv mit Hilfe von Carriern zurücktransportiert (Saccharoserecovery), ein anderer verbleibt im Apoplasten oder wird von den angrenzenden Parenchymzellen aufgenommen.

Suchhyphen, die auf Siebröhren treffen, legen sich eng an die Wand an und umschließen die Siebröhren wie die Finger einer Hand und bilden zahlreiche Wandprotuberanzen zur Vergrößerung der Oberfläche aus. Die an dieser Stelle aus der Siebröhre austretende Saccharose wird durch Carrier im Plasmalemma der Hyphe aus dem Apoplasten sehr effektiv aufgenommen und so dem recovery entzogen. Daneben kann vielleicht über einen kurzen Zeitraum auch eine Aufnahme von Substanzen aus den Parenchymzellen über die in den Suchhyphen ausgebildeten Plasmodesmen erfolgen.

In der zweiten Phase der Entwicklung ab 12-14 Tage nach Ansetzen des Parasiten an den Wirt bestehen direkte Verbindungen zwischen dem Phloem des Wirtes und der Absorptionshyphe des Parasiten (Ausbildung sekundärer Plasmodesmen). Es findet für alle im Phloem des Wirtes transportierten Verbindungen ein symplastischer Transfer in die Absorptionshyphen des Parasiten statt.

Damit wäre der Übergang der stark hydrophilen Farbstoffe, der Viren und des GFP erklärbar sowie die Tatsache, daß bei gleichzeitiger Applikation von zwei ganz unterschiedlichen Substanzen stets übereinstimmende Anteile in den Parasiten gelangen.

Neben diesem symplastischen Weg bleibt besonders für Assimilate die Möglichkeit eines Transports über die Membran weiter bestehen, wird aber in diesem Stadium eine untergeordnete Rolle spielen. Für unterirdische Kartoffelsprosse konnte im Lauf der Entwicklung ein Übergang von apoplastischer Phloementladung während des Längenwachstums unter Beteiligung einer sauren zellwandgebundenen Invertase zu symplastischer Entladung bei beginnender Schwellung der Kartoffelknolle gezeigt werden (VIOLA et al., 2001).

Zur Absicherung unseres Modells sind ultrastrukturelle Untersuchungen an dem von uns untersuchten W-P-S sowie an dem W-P-S *Vicia faba-Cuscuta reflexa* notwendig, zu dem schon eine ganze Reihe von physiologischen Daten vorliegen. Diese müßten sehr kritisch in bezug auf das Alter der verwendeten Systeme analysiert werden bzw. durch

Untersuchungen über den gesamten Zeitraum der Haustorienentwicklung ausgedehnt werden. So könnten die in diesem System von WOLSWINKEL (1983) gefundenen hohen Saccharose-Konzentrationen im Apoplasten parasitierter *Vicia*-Achsen, die von SAMODELKIN (1990) nicht bestätigt werden konnten, darin begründet sein, daß in beiden Fällen unterschiedlich alte Wirt-Parasit-Systeme mit unterschiedlichen Wegen des Übergangs vom Wirt zum Parasit untersucht wurden.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde der Transport von phloemmobilen Substanzen aus kompatiblen Wirtspflanzen in den Parasiten *Cuscuta reflexa* untersucht und auf der Grundlage der Ergebnisse ein Modell für ihren Transfer entwickelt.

Zur Charakterisierung der source-sink Beziehungen und der Verteilungsverhältnisse von Assimilaten und xenobiotischen Substanzen während der Etablierung und Funktionalität des Phloemkontaktes wurden isolierte Blätter von *Pelargonium zonale* als Wirt verwendet. Die Untersuchungen zum Transfer der phloemmobilen Fluoreszenzfarbstoffe 5,6 Carboxyfluoreszein (CF) und 8-Hydroxypyren-1,3,6-Trisulfonsäure (HPTS) sowie des GFP-exprimierenden Kartoffel Virus X erfolgte im Wirt-Parasit-System *Nicotiana benthamiana-Cuscuta reflexa*.

Für Experimente zur Translokation des green fluorescent protein (GFP) standen uns Pflanzen von *Nicotiana tabacum* cv. Sumsai als Wirt zur Verfügung, die GFP in ihren Geleitzellen unter der Kontrolle des AtSUC 2 Promotors exprimieren.

Nach Etablierung eines funktionellen Phloemkontaktes, was in der Regel 16 Tage nach Anlegen des Parasiten an Blattstiel oder Sproßachse der Wirtspflanzen abgeschlossen war, stellte der Parasit in allen untersuchten Systemen den dominierenden sink dar. Bereits bei einer Translokationszeit von 3 Stunden wurden zwischen 60% und 85% der transportierten Substanzen im Parasiten nachgewiesen. Eine Untersuchung der source-sink Verhältnisse im Wirt-Parasit-System *Pelargonium-Cuscuta* zeigte, daß dieser starke Stoffentzug auch dann bestehen bleibt, wenn die wachsende Spitzenregion des Parasiten abgeschnitten und die Achse schrittweise bis auf die in das Wirtsgewebe eingedrungenen Haustorien verkürzt wurde.

Der Stoffübertritt zwischen Wirt und Parasit erfolgt lokal sehr begrenzt an der Kontaktstelle der Haustorien. Die Lokalisation der vom Wirt in den Parasiten transportierten radioaktiv markierten Verbindungen mittels Phosphorimager zeigte die Haustorien als Orte der höchsten Konzentration an radioaktiven Substanzen. Die Fraktionierung der im W-P-S *Pelargonium-Cuscuta* nach Begasung der Wirtsspreite mit  $^{14}\text{CO}_2$  auftretenden radioaktiven Verbindungen ergab, daß Saccharose in Wirt und Parasit die Haupttransportsubstanz darstellt. Im haustorienbildenden und im freien Achsenabschnitt des Parasiten lagen bei Translokationszeiten zwischen 3 und 24 Stunden 70-80% der radioaktiv markierten Zucker als Saccharose vor. In der Spitzenregion war der Anteil der Saccharose deutlich geringer, er lag zwischen 57,3% nach 3 Stunden und 38,2% nach 24 Stunden. Parallel dazu nahm in diesem Abschnitt der Anteil an Glucose und Fructose zu. Die Werte stehen in guter

Übereinstimmung mit den Untersuchungen zur Enzymaktivität von Saccharose-Synthase und den verschiedenen Invertasen. Der apikale Abschnitt der *Cuscuta*-Achse ist auch bevorzugter Ort der Stärkespeicherung.

Die Werte für die Stärkeverteilung entlang der Achse korrelieren mit den durchgeführten Messungen der ADP-Glucose-Pyrophosphorylase-Aktivität, deren höchste Aktivität in der *Cuscuta*-Spitze gemessen wurde.

Bestimmungen der Aktivität der sauren zellwandgebundenen Invertase während und nach Ausbildung des Phloemkontaktes zwischen *Perlargonium zonale* und *Cuscuta reflexa* gaben keinen Hinweis auf eine Spaltung der Saccharose beim Übertritt vom Wirtsploem in die Hyphenzellen des Parasiten.

Translokationsuntersuchungen mit einem breiten Spektrum radioaktiv markierter Substanzen (Saccharose, Aminosäuren, pflanzliche Hormone und Xenobiotika) lassen den Schluß zu, daß der Parasit nicht in der Lage ist, aus den im Wirtsploem transportierten Verbindungen auszuwählen. Von allen untersuchten Verbindungen traten unabhängig von ihren physikochemischen Eigenschaften nach dreistündiger Translokationszeit  $\approx$  60% im Parasiten auf. Auch bei gleichzeitiger Applikation von zwei unterschiedlich markierten Substanzen wurden übereinstimmende Anteile im Parasiten gemessen. Diese Ergebnisse sprechen auch gegen einen apoplastischen Transfer der Substanzen zwischen Wirt und Parasit.

Mit Hilfe molekularbiologischer Methoden konnte gezeigt werden, daß *Cuscuta* in der Lage ist, den ausschließlich symplastisch wandernden GFP-exprimierenden Kartoffel Virus X von infizierten auf virusfreie Pflanzen von *Nicotiana benthamiana* zu übertragen.

Eine Untersuchung von Gewebeschnitten an der Kontaktstelle zwischen Wirtsploem und Haustorium mit dem Konfokalen Laser Scanning Mikroskop ließ für die als symplastische Marker geltenden Fluoreszenzfarbstoffe CF und HPTS einen direkten Übertritt aus den Leitbündeln des Wirtes in die Hyphenzellen des Parasiten erkennen.

Durch Parasitierung transgener Pflanzen von *Nicotiana tabacum* cv. Sumsai, welche in ihren Geleitzellen GFP unter der Kontrolle des AtSUC 2 Promotors exprimieren, konnte gezeigt werden, daß ein rein symplastisch, mit dem Assimilatstrom wanderndes Protein von 27kDa in einem der Translokation der Fluoreszenzfarbstoffe analogen Muster in den Parasiten übertrat und in seine Sinks entladen wurde.

Die Ergebnisse der Untersuchungen zur Translokation von Fluoreszenzfarbstoffen, von Viren und von GFP sprechen eindeutig dafür, daß es sich bei dem funktionellen Phloemkontakt zwischen *Cuscuta reflexa* und ihren Wirten um eine symplastische Verbindung handelt.

## 7 LITERATUR

- Anthelme, F. und Marigo, G. (1998): Glyphosate uptake in *Catharanthus roseus* cells: Involvement of a plasma membrane redox system? *Pest. Biochem. Physiol.* **62** (2), 73-86.
- Baker, D. A. (1978): Proton-co-transport of organic solutes by plant cells. *New Phytol.* **81**, 485-497.
- Balachandran, S., Xiang, Y., Thompson, G. A. und Lucas, W. J. (1997): Phloem sap proteins of *Cucurbita maxima* and *Ricinus communis* have the capacity to traffic cell to cell through plasmodesmata. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 14150-14155.
- Bäumel, P., Jeschke, W. D., R  th, N., Czygan, F.-C. und Proksch, P. (1995), Modelling of quinolizidine alkaloid net flows in *Lupinus albus* and between *L. albus* and the parasite *Cuscuta reflexa*: new insights into the site of quinolizidine alkaloid synthesis. *J. Exp. Bot.* **46** (292), 1721-1730.
- Bennett, C. W. (1940): Acquisition and transmission of viruses by dodder (*Cuscuta subinclusa*). *Phytopathology* **30**, 2.
- Bennett, C. W. (1956): Biological relations of plant viruses. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **7**, 143-170.
- Bigalke, H. M. (1974): *Cuscuta reflexa* als Testorganismus für das Mobilitätsverhalten von 5 verschiedenen radioaktiv markierten Substanzen im Wirt-Parasit-System *Vicia faba*-*Cuscuta reflexa* Roxb. Diplomarbeit Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Naturwissenschaftliche Fakultät.
- Birschwilks, M. (2000): Untersuchungen zur Ernährungsweise isolierter Achsen der parasitischen Blütenpflanze *Cuscuta reflexa* ROXB. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- B  ckenhoff, A., D. Prior, A. M., Grundler, F. M. W. und Oparka, K. J. (1996): Induction of phloem unloading in *Arabidopsis thaliana* roots by the parasitic nematode *Heterodera schachtii*. *Plant Physiol.* **112**, 1421-1427.
- Bouya, D. (1986): Etude de l'absorption du saccharose par les sucoirs d'une phanerogame parasite: *Cuscuta reflexa* Roxb. These de Doctorat. Universite Scientifique et Medicale de Grenoble.
- Buysse, J. und Merckx, R. (1993): An improved colorimetric method to quantify sugar content of plant tissue. *J. Ex. Bot.* **44**, 1627-1629.
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W. und Prasher, D. C. (1994): Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* **263**, 802-805.
- Chen, W. H., Taliercio, E. W. und Chourey, P. S. (1996): The *Miniature 1* seed locus of

- maize encodes a cell-wall invertase required for normal development of endosperm and maternal cells in the pedicel. *Plant Cell* **8**, 971-983.
- Cole, L., Coleman, J., Kearns, A., Morgan, G. und Hawes, C. (1991): The organic anion transport inhibitor, Probenecid, inhibits the transport of Lucifer Yellow at the plasma membrane and the tonoplast in suspension-cultured plant cells. *J. Cell Sci.* **99**, 545-555.
- Damon, S., Hewitt, J., Nieder, M. und Bennett, A. B. (1988): Sink metabolism in tomato fruit. II. Phloem unloading and sugar uptake. *Plant Physiol.* **87**, 731-36.
- Dawson, J. H., Dörr, I., Musselman, L. J. und Wolswinkel, P. (1994): Biology and Control of *Cuscuta*. *Red. Weed Sci.* **6**, 265-317.
- De Bock, F. (1990): Contribution l'étude des mecanismes impliquees dans le transfert du saccharose, l'interface hote-parasite, entre *Pelargonium zonale* L. Aiton et *Cuscuta reflexa* Roxb. These de Doctorat. Universite Scientifique et Medicale de Grenoble.
- De Bock, F. und Fer, A. (1992): Effects of abscisic acid on the transfer of sucrose from host, *Pelargonium zonale* (L.) Aiton, to a phanerogamic parasite, *Cuscuta reflexa* Roxb. *Austr. J. Plant Physiol.* **19**, 679-691.
- De Stefanis, V. A. und Ponte, J. G. (1968): Separation of sugars by thin layer chromatography. *J. Chromatogr.* **56**, 99-124.
- Delrot, S., Fauchner, M., Bonnemain, J.-L. und Bonmort, J. (1983): Nycthermal changes in intracellular and apoplastic sugars in *Vicia faba* leaves. *Physiol. Vég.* **21**, 459-467.
- Ding, X.S., Carter, S.A., Deom, C.M. und Nelson, R.S (1998): Tobamovirus and potyvirus accumulation in minor veins of inoculated leaves from representattives of the *Solanaceae* and *Fabaceae*. *Plant Physiol.* **116**, 125-136.
- Dörr, I. (1968): Zur Lokalisierung von Zellkontakten zwischen *Cuscuta odorata* und verschiedenen höheren Wirtspflanzen. *Protoplasma* **65**, 435-448.
- Dörr, I. (1969): Feinstruktur intrazellulär wachsender *Cuscuta*-Hyphen. *Protoplasma* **67**, 123-137.
- Dörr, I. (1972): Der Anschluß der *Cuscuta*-Hyphen an die Siebröhren ihrer Wirtspflanzen. *Protoplasma* **75**, 167-184.
- Dörr, I. (1990): Sieve Elements in Haustoria of Parasitic Angiosperms. In: Behnke, H.-D. und Sjolund, R.-D. (eds.), Sieve elements – comparative structure, induction and development. Springer Verlag, Berlin-Heidelberg New York, 239-256.
- Duckett, C. M., Oparka, K. J., Prior, D. A. M., Dolan, L. und Roberts, K. (1994): Dye-coupling in the root epidermis of *Arabidopsis* is progressively reduced during development. *Development* **120**, 3247-3255.
- Ehness, R. und Roitsch, T. (1997): Differential effect of D-glucose on the level of mRNAs for

- three invertase isoenzymes of *Chenopodium rubrum*. J. Plant Physiol. **150**, 514-519.
- Esau, K. (1948): Some anatomical aspects of plant virus disease problems II. The Bot. Review **17**, 413-449.
- Esau, K. (1967): Anatomy of plant virus infection. Annu. Rev. Phytopathol. **5**, 45-76.
- Eschrich, W. (1980): Free space invertase, its possible role in phloem unloading. Ber. Deutsch. Bot. Ges. **93**, 363-378.
- Eschrich, W. und Eschrich, B. (1992): Control of phloem unloading by source activities and light. Plant Physiology and Biochemistry **25**, 625-634.
- Fer, A. (1978): Importance du saccharose dans les échanges trophiques entr l'hôte (*Pelargonium zonale* L. Aiton) et le parasite (*Cuscuta lupuliformis* Krock). Physiol. Veg. **15**, 313-324.
- Fer, A. (1981): Recherches sur les voies de transport implicées dans l'alimentation d'une phaeogame parasite. Étude sur es feuilles isolées parasitées par *Cuscuta*. Physiol. Veg. **19**, 177-196.
- Fisher, D. B., Wu, Y. und Ku, M. S. B. (1992): Turnover of soluble proteins in the wheat sieve tube. Plant Physiol. **100**, 1433-1441.
- Glazious, K. T. und Gayler, K. R. (1972): Storage of sugars in stalks of sugar cane. Bot. Rev. **38**, 471-490.
- Godt, D. E. und Roitsch, T. (1997): Regulation and tissue-specific distribution of mRNAs for three extracellular invertase isoenzymes of *Tomato* suggests an important function in establishing and maintaining sink metabolism. Plant Physiol. **115**, 273-282.
- Golecki, B., Schulz, A. und Thompson, A. G. (1999): Translocation of structural P proteins in the phloem. Plant Cell **11**, 127-140.
- Grignon N., Touraine, B. und Durand, M. (1989): 6(5) Carboxyfluorescein as a tracer of phloem sap translocation. American J. of Bot. **76**, 871-877.
- Grimm, E., Bernhardt, G., Rothe, K. und Jacob, F. (1990): Mechanism of sucrose retrieval along the phloem path – a kinetic approach. Planta **182**, 480-485.
- Grimm, E., Grube, A., Jahnke, S. und Neumann, St. (1995): Retention of xenobiotics along the phloem path. Planta **197**, 11-18.
- Guerttard (1744): Mémoire sur l'adhérence de la *Cuscuta* aux autres plantes. Hist. De l'Acad. Roy. Sci. Paris 170-190.
- Gunning, B. E. S. (1977): Transfer cells and their roles in transport of solutes in plants. Sci. Prog., Oxf. **64**, 539-568.
- Haupt, S. (1994): Untersuchungen zum Stoffübertritt zwischen Wirtspflanzen und *Cuscuta reflexa* Roxb. Unter besonderer Berücksichtigung der Free-Space-Invertase. Diplomarbeit, Fachbereich Biologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

- Haupt, S. und Neumann, St. (1996): Transfer of assimilates and xenobiotics from host plants to the parasite *Cuscuta reflexa* Roxb. In: Advances in Parasitic Plant, Research, eds. Moreno, M. T., Cubero, J. I., Berner, D., Joel, D., Musselman, L. J. und Parker, C., 355-364.
- Haupt, S., Oparka, K. J., Sauer, N. und Neumann, St. (2001 a): Macromolecular trafficking between *Nicotiana tabacum* and the holoparasite *Cuscuta reflexa*. J. Exp. Bot.,(im Druck)
- Haupt, S., Duncan, G., Holzberg, S. und Oparka, K. (2001 b): Evidence for symplastic unloading in sink leaves of barley. Plant Phys. **125**, 209-218.
- Heintz, W. (1989): Transmission of a new mycoplasma-like organism (MLO) from *Cuscuta odorata* (Ruiz et Pav.) to herbaceous plants and attempts to its elimination in the vector. J. Phytopathol. **125**, 171-186.
- Hibbert, J. M., Bungard, R. A., Press, M. C., Jeschke, W. D., Scholes, J. D. und Quick, W. P. (1998): Localization of photosynthetic metabolism in the parasitic angiosperm *Cuscuta reflexa*. Planta **205**, 506-513.
- Hosford, R. M. (1967): Transmission of plant viruses by *dodder*. Bot. Rev. **33**, 387-406.
- Ihl, B., Jacob, F. und Sembdner, G. (1984): Studies on *Cuscuta reflexa* Roxb. V. The level of endogenous hormones in the parasite *Cuscuta reflexa* and its host *Vicia faba* L., and a suggested role in the transfer of nutrients from host to the parasite. Plant Growth Regul. **2**, 77-90.
- Ihl, B., Jacob, F., Meyer, A. und Sembdner, G. (1987): Investigation in the endogenous levels of abscisic acid in a range of parasitic phanerogames. J. Plant Growth Regul. **5**, 191-205.
- Ihl, B. und Wiese, K. (2000): Studien an *Cuscuta reflexa* Roxb.: VIII. Mechanische Haustorieninduktion an nichtwindenden Achsen des Parasiten. Flora **195**, 1-8.
- Imlau, A., Truenit, E. und 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 tissue. Plant Cell **11**, 309-322.
- Ishiwatari, Y., Fujiwara, T., MCFarland, K. C., Nemoto, K., Hayashi, H., Chino, M. und Lucas, W. J. (1998): Rice phloem thioredoxin h has the capacity to mediate its own cell-to-cell transport through plasmodesmata. Planta **205**, 12-22.
- Israel, S., Dörr, I. und Kollmann, R. (1980): Das Phloem der Haustorien von *Cuscuta*. Protoplasma **103**, 309-321.
- Jacob, F. (1966): Zur Auslösung des Blühvorganges bei der Kurztagpflanze *Cuscuta reflexa* Roxb. Flora, Abt. A, **156**, 558-572.
- Jacob, F. und Neumann, St. (1968): Studien an *Cuscuta reflexa* Roxb. I. Zur Funktion der

- Haustorien bei der Aufnahme von Saccharose. *Flora*, Abt. A, **159**, 191-203.
- Jacob, F., Strobel, U., Engelbrecht, L. und Schulz, W. (1975): Studien an *Cuscuta reflexa* Roxb. III. Zur Frage einer cytokininabhängigen Nährstoffaufnahme. *Biochem. Physiol. Pflanzen* **168**, 349-359.
- Jahnke, B. (1975): Untersuchungen zum Transport xenobiotischer Stoffe im Wirt-Parasit-System *Vicia faba-Cuscuta reflexa*. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Naturwissenschaftliche Fakultät.
- Jeuffroy, M. H. und Warembourg, F. R. (1991): Carbon transfer and partitioning between vegetative and reproductive organs in *Pisum sativum* L. *Plant Physiol.* **97**, 440-448.
- Jeschke, W. D., Rath, N. und Bäuml, P. (1994a): Modelling the flow and partitioning of carbon and nitrogen in the holoparasite *Cuscuta reflexa* Roxb. and its host *Lupinus albus* L. I. Methods for estimating net flows. *J. of Exp. Bot.* **45**, 791-800.
- Jeschke, W. D., Rath, N. und Bäuml, P. (1994b): Modelling the flow and partitioning of carbon and nitrogen in the holoparasite *Cuscuta reflexa* Roxb. and its host *Lupinus albus* L. II. Flows between host and parasite and within the parasitized host. *J. of Exp. Bot.* **45**, 801-812.
- Jeschke, W. D., Bäuml, P. und Rath, N. (1995): Partitioning of nutrients in the *Cuscuta reflexa-Lupinus albus* association. *Aspects of Applied Biology* **42**, 71-79.
- Jeschke, W. D. und Hilpert, A. (1997): Sink-stimulated photosynthesis and sink-dependent increase in nitrate uptake: nitrogen and carbon relations of the parasitic association *Cuscuta reflexa-Ricinus communis*. *Plant, Cell and Environment* **20**, 47-56.
- Keller, F. und Matile, P. (1989): Storage of sugars and mannitol in petioles of *celery* leaves. *New Phytologist* **113**, 291-299.
- Kindermann, A. (1928): Haustorialstudien an *Cuscuta*-Arten. *Planta* **5** (5), 769-783.
- King, R. W. und Zeevarrd, J. A. D. (1974): Enhancement of phloem exudation from cut petioles by chelating agents. *Plant Physiol.* **53**, 96-103.
- Knoblauch, M. und van Bel, A. E. J. (1998): Sieve tubes in action. *The Plant Cell*, **10**, 5-50.
- Koch, L. (1874): Untersuchungen über die Entwicklung der *Cuscuteen*. *Bot. Abhandlung* **2** (3), 1-197.
- Koch, K. E., Nolte, K. D., Duke, E. R., McCarty, D. R. und Avigne, W. T. (1992): Sugar levels modulate differential expression of maize sucrose synthase genes. *Plant Cell* **4**, 59-69.
- Kollman, R. und Dörr, I. (1969): Strukturelle Grundlagen des zwischenzelligen Stoffaustausches. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.*, **82** (5/6), 415-425.
- Kuijt, J. (1969): *The biology of parasitic flowering plants*. Univ. California Press, Berkeley, CA ,246 ff.

- Lingle, S. E. (1989): Evidence for uptake of sucrose intact into sugar cane internods. *Plant Physiol.* **90**, 6-8.
- Machado, M. A. und Zetsche, K. (1990): A structural, functional and molecular analysis of the holoparasite *Cuscuta reflexa* and *Cuscuta europeae*. *Plant Physiology* **181**, 91-96.
- Marcone, C., Hergenbahn, F., Ragozzino, A. und Seemüller, E. (1999): Dodder transmission of pear decline, european stone fruit yellows, rubrus stunt, picris echioides yellows and cotton phyllody phytoplasmas to periwinkle. *J. Phytopath.* **147**, 187-192.
- Martin, M. M. und Lindquist, L. (1976): The pH-dependence of fluorescein fluorescence. *Journal of Luminescence* **10**, 381-390.
- Miller, E. M. und Chorey, P. S. (1992): The maize invertase-deficient *miniature-1* seed mutation is associated with aberrant pedicel and endosperm development. *Plant Cell* **4**, 297-305.
- Minchin, P. E. H. und Thorpe, M. R. (1984): Apoplastic unloading in stem of bean. *J. Exp. Bot.* **35**, 538-550.
- Minchin, P. E. H., Ryan, K. G., Thorpe, M. R. (1984): Further evidence of apoplastic unloading into the stem of bean: identification of the phloem buffering pool. *J. Exp. Bot.* **35**, 1744-1753.
- Münch, E. (1930): *Die Stoffbewegungen in der Pflanze*. G. Fischer Verlag Jena, Deutschland.
- Neumann, St. (1982): *Untersuchungen zur Mobilität von Xenobiotikain höheren Pflanzen*. Habilitationsarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- Neumann, St., Grimm, E. und Jacob, F. (1985): Transport of xenobiotics in higher plants. I. Structural prerequisites for translocation the phloem. *Biochem. Physiol. Pflanzen* **180**, 57-268.
- Neumann, St. und Haupt, S. (1996): Sucrose hydrolysis by invertase is no prerequisite for the transfer of assimilates from host plants to the parasite *Cuscuta reflexa*. *J. Exp. Bot.* **47**, 1302-1303.
- Oparka, K. J. und Prior, D. A. M. (1988): Movement of Lucifer yellow CH in potato tuber storage tissues: A comparison of symplastic and apoplastic transport. *Planta*, **176**, 533-540.
- Oparka, K. J. (1991): Uptake and compartmentation of fluorescent probes by plant cells. *J. Exp. Bot.* **42** (238), 565-579.
- Oparka, K. J., Dukett, C. M., Proir, D. A. M. und Fisher, D. B. (1994): Realtime imaging of phloem unloading in the root tip of *Arabidopsis*. *Plant J.* **6**, 756-766.
- Oparka, K. J., Roberts, A. S., Boevink, P., Santa Cruz, S., Roberts, I., Pradel, K. S., Imlau,

- A., Kotlizky, G., Sauer, N. und Epel, B. (1999): Simple, but not branched, plasmodesmata allow the nonspecific trafficking of protein in developing tobacco leaves. *Cell* **97** (6), 743-754.
- Patrick, J. W. (1990): Sieve element unloading: cellular pathways, mechanisms and control. *Physiologia Plantarum* **78**, 298-308.
- Peirce, G. J. (1893): On the structure of the haustoria of some phanerogamic parasites. *Ann. Bot. (London)* **7**, 291-327.
- Pennings, S. C. und Callaway, R. M. (1996): Impact of a parasitic plant on the structure and dynamics of a salt marsh vegetation. *Ecology* **77**, 1410-1419.
- Peterson, C. A. und Emanuel, M. E. (1981): Pathways of movement of apoplastic fluorescent dye tracer through the endodermis at the site of secondary root formation in corn (*Zea mays*) and broad bean (*Vicia faba*). *Can. J. Bot.* **59**, 618-625.
- Pradel, K. S., Rezmer, C., Krausgrill, S., Rausch, T. und Ullrich, C. I. (1996): Evidence for symplastic phloem unloading with concomitant high activity of acid cell wall invertase in *Agrobacterium tumefaciens*-induced plant tumours. *Bot. Acta* **109**, 397-404.
- Press, M. C. und Whittaker, J. B. (1993): Exploitation of the xylem stream by parasitic organisms. *Philosophical transactions of the royal society of London B* **341**, 101-111.
- Quick, W. P. und Schaffner, A. A. (1996): Sucrose metabolism in sources and sinks. In: Zamski, E., Schaffner, A. (Hrsg.) *Photoassimilate Distribution in Plants and Crops: Source-Sink Relationships*. New York (M. Decker) 115-156.
- Renault, S., Despeghel-Caussin, C., Bonnemain, J. C. und Delrot, S. (1990): The proton electrical transmembrane gradients generated by the transfer cells of the haustorium of *Polytrichum formosum* and their use in the uptake of amino acids. *Plant Physiol.* **90**, 913-920.
- Ricardo, C. P. P. und ap Rees, T. (1970): Invertase activity during the development of carrot roots. *Phytochemistry* **9**, 239-247.
- Ricardo, C. P. P. (1974): Alkaline  $\beta$ -fructosidases of tuberous roots; possible physiological function. *Planta* **118**, 333-343
- Richter, A. und Popp, M. (1992): The physiological importance of accumulation of cyclitols in *Viscum album* L. *New Phytol.* **121** (3), 431-438.
- Roberts, A. G., Santa Cruz, S., Roberts, I. M., Prior, D. A. M., Turgeon R. und Oparka, K. J. (1997): Phloem Unloading in Sink Leaves of *Nicotiana benthamiana*: Comparison of a Fluorescent Solute with a Fluorescent Virus. *The Plant Cell*, Vol. **9**, 1381-1396.
- Roitsch, T., Bittner, M. und Godt, D. E. (1995): Induction of apoplasmic invertase of *Chenopodium rubrum* by D-glucose and a glucose analogue and tissue-specific expression suggest a role in sink-source regulation. *Plant Physiology* **108**, 285-294.

- Roitsch, T. (1999): Source-sink regulation by sugar and stress. *Current opinion in Plant Biology* **2**, 198-206.
- Roos, U.-P. und Aldrich, H. (1988): Intracellular localization and morphology of rhabdovirus-like particles in dodder (*Cuscuta spec.*). *Can. J. Bot.* **66**, 2499-2504.
- Rothe, K. (1994): Assimilattransport in *Cyclamen persicum* Mill. – Analyse des Kohlenhydratspektrums und der Verteilungsprozesse entlang des path. Dissertaion, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Naturwissenschaftliche Fakultät.
- Rothe, K., Diettrich, B., Rahfeld, B. und Luckner, M. (1999): Uptake of phloem-specific cardenolides by *Cuscuta* sp. Growing on *Digitalis lanata* and *Digitalis purpurea*. *Phytochemistry* **51**, 357-361.
- Ruan, Y-L., Brady, C. J. und Patrick, J. W. (1996): Chemical composition of apoplast sap from intact developing tomato fruit. *Austr. J. Plant Physiol.* **23**, 9-13.
- Samodelkin, P. (1990): Erarbeitung eines Versuchssystems zur Untersuchung des Stoffübertritts zwischen Wirtspflanze und *Cuscuta reflexa* Roxb. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Naturwissenschaftliche Fakultät.
- Schmalstig, J. G. und Geiger, D. R. (1985): Phloem unloading in developing leaves of sugar beet. *Plant Physiol.* **79**, 237-241.
- Schmelzer, K. (1958): Beiträge zur Kenntnis der Übertragbarkeit von Viren durch *Cuscuta*-Arten. *Phytophat. Z.* **28** (1), 1-56.
- Schobert, C., Grossmann, P., Gottschalk, M., Komor, E., Pecsvaradi, A. und Zur Nieden, U. (1995): Sieve-tube exudate from *Ricinus communis* L. seedlings contains ubiquitin and chaperons. *Planta* **196**. 205-210.
- Schöning, U. und Kollmann, R. (1995): The function of phloem connections in regenerating in vitro-grafts. *Bot. Acta* **108**, 56-62.
- Schulz, A. (1995): Plasmodesmal widening accompanies the short-term increase in symplasmic phloem unloading in *pea* root tips under osmotic stress. *Protoplasma* **188**, 22-37.
- Schulz, A. (1998): Phloem. Structure related to function. *Prog. Bot.* **59**, 430-477.
- Schulz, A. (2000): Untersuchungen zum Wachstum und zum Kohlenhydrathaushalt von *Cuscuta reflexa* ROXB. Während der Parasitierung von *Vicia faba*. Staatsexamensarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Schumacher, W. (1933): Untersuchungen über die Wanderung des Fluoreszeins in den Siebröhren. *Jahrb. Wiss. Bot.* **77**, 685-732.
- Schumacher, W. (1934): Die Absorptionsorgane von *Cuscuta odorata* und der Stoffübertritt aus den Siebröhren der Wirtspflanze. *Jahrb. Wiss. Bot.* **80**, 74-91.
- Schumacher, W. und Halbsguth, W. (1938): Über den Anschluß einiger höherer Parasiten

- an die Siebröhren der Wirtspflanzen. Ein Beitrag zum Plasmodesmenproblem. Jahrb. Wiss. Bot. **87**, 324-355.
- Schwimmer, S. und Bevenne, A. (1956): Reagent for differentiation of 1,4- and 1,6-linked glucosaccharides. *Science* **123**, 543-544.
- Silva, M. P. und Ricardo, C. P. P. (1992):  $\beta$ -fructosidases and *in vitro* dedifferentiation–redifferentiation in carrot cells. *Phytochemistry* **31**, 1507-1511.,
- Singh, M., Singh, D. V., Misra, P. C., Tewari, K. K. und Krishnan, P. S. (1968): Biochemical aspects of parasitism by the angiosperm parasites: starch accumulation. *Physiologia Plantarum* **21**, 525-538.
- Singh, D. V., Beg, M. U., Mattoo, R. L., Lal, R. K., Viswanathan, P. N. und Krishnan, P. S. (1970): Carbohydrate metabolism in *Cuscuta*. *Phytochemistry* **9**, 1779-1785.
- Socolar, S. J. und Loewenstein, W. R. (1979): Cell-to-cell junctional transmission. In: Korn, E. D., ed. *Methods in membrane biology* 10. New York Press, 123-179.
- Srivastava, S., Nighojkar, A. und Kumar, A. (1994): Multiple forms of pectin methylesterase from *Cuscuta reflexa* filaments. *Phytochemistry* **37** (5), 1233-1236.
- Stadler, R. und Sauer, N. (1995): The *Arabidopsis thaliana* AtSUC2 gene is specifically expressed in companion cells. *Bot. Acta* **109**, 299-306.
- Stadler, R., Brandner, J., Gahrtz, M., Sauer, N. und Schulz, A. (1996): The sucrose transporter PmSUC2 of *Plantago major* L. is expressed only in companion cells. *J. Exp. Bot.* **47** (si), 1312.
- Stewart, W. W. (1981): Lucifer dyes – highly fluorescent dyes for biological tracing. *Nature* **292**, 17-21.
- Strobel, U. (1967): Untersuchungen zur Aufnahme von stickstoffhaltigen Verbindungen und von Zuckern durch *Cuscuta reflexa* ROXB. Diplomarbeit, Institut für Allgemeine Botanik, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Strobel, U., Neumann, St. und Jacob, F. (1969): Studien an *Cuscuta reflexa* Roxb.: II. Über das Vorkommen von Invertase in *Cuscuta reflexa* Roxb. *Flora, Abt. A* **160**, 415-421.
- Strobel, U. (1970): Aufnahme und Stoffwechsel von Kohlenhydraten in *Cuscuta reflexa*. Dissertation, Martin-Luther-Universität, Biowissenschaften.
- Sturm, A. und Chrispeels, M. J. (1990): cDNA cloning of carrot extracellular  $\beta$ -fructosidase and its expression in response to wounding and bacterial infection. *Plant Cell* **2**, 1107-1119.
- Sturm, A., Sebkova, V., Lorenz, K., Hardegger, M., Lienhard, S. und Unger, C. (1995): Development- and organ-specific expression of the genes for sucrose synthase and three isoenzymes of acid  $\beta$ -fructosidase in *carrot*. *Planta* **198**, 601-610.
- Sturm, A. und Tang, G.-Q. (1999): The sucrose-cleaving enzymes of plants are crucial for

- development, growth and carbon partitioning. *TIPS* **4** (10), 401-407.
- Suthof, C. (1968): Transport <sup>14</sup>C-markierter Assimilate im Wirt-Parasit-System *Vicia faba-Cuscuta reflexa* Roxb. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Sektion Biowissenschaften.
- Tang, G. Q., Lüscher, M. und Sturm, A. (1999): Antisense repression and vacuolar and cell wall invertase in transgenic carrot alters early plant development and sucrose partitioning. *Plant Cell* **11**, 1-14.
- Tanner, W. (1980): On the possible role of ABA on phloem unloading. *Ber. Deutsch. Bot. Ges.* **93**, 349-251.
- Tetlow, I. J. und Farrar, J. F. (1993): Apoplastic sugar concentration and pH in *Barley* leaves infected with *brown rust*. *J. Exp. Bot.* **44** (262), 929-936.
- Thom, M. und Maretzki, A. (1992): Evidence for direct uptake of sucrose by *sugarcane* stalk. *J. Plant Physiol.* **139**, 555-559.
- Thompson, A. G. und Schulz, A. (1999): Macromolecular trafficking in the phloem. *TIPS* **4** (9), 354-360.
- Troll, W. (1939): Vergleichende Morphologie der höheren Pflanzen. Vol. 1 ? Teil 2. Gebrüder Borntraeger, Berlin, 1029-1032.
- Tsivion, Y. (1978a): Possible role of cytokinins in nonspecific recognition of a host and in early growth of haustoria in the parasitic plant, *Cuscuta campestris*. *Bot. Gaz.* **139**, 27-31.
- Tsivion, Y. (1978b): Loading of assimilates and some sugars into the translocation system of *Cuscuta*. *Aust. J. Plant Physiol.* **5**, 851-857.
- Turgeon, R. und Webb, J. A. (1973): Leaf development and phloem transport in *Cucurbita pepo*: Transition from import to export. *Planta* **113**, 179-191.
- Turgeon, R. (1987): Phloem unloading in tobacco sink leaves: Insensitivity to anoxia indicates a symplastic pathway. *Planta* **171**, 73-81.
- Tymowska-Lalanne, Z. and Kreis, M. (1998): The plant invertases: physiology, biochemistry and molecular biology. *Adv. Bot. Res.* **28**, 71-117.
- Tyree, M.T., Peterson, C.A., Edgington, L.V. (1979): A simple theory regarding ambimobility of xenobiotics with the special reference to the nematicide, oxamyl. *Plant Physiol.* **63**, 367-374
- Van Bel, A. J. E. (1992a): Mechanisms of sugar translocation. In: N. R. Baker and H. Thomas eds., *Crop photosynthesis: spatial and temporal determinants*, Elsevier Amsterdam. 177-211.
- Van Bel, A. J. E., Gamalei, Y. V., Ammerlaan, A. und Bik, L. P. M. (1992b): Dissimilar phloem loading in leaves with symplasmic or apoplasmic minor-vein configurations.

- Planta **186**, 518-525.
- Viola, R., Roberts, A. G., Haupt, S., Gazzani, S., Hancock, R., Marmioli, N. und Oparka, K. J. (2001): Tuberisation in potato involves a switch from apoplastic to symplastic phloem unloading. *Plant Cell* **13** (im Druck).
- Vreugdenhil, D. (1983): Abscisic acid inhibits phloem loading of sucrose. *Physiol. Plant.* **57**, 463-467.
- Von Mohl, H. (1827): Über den Bau und das Winden und Ranken der Schlingpflanzen. Preisschrift der Medizinischen Fakultät Tübingen 1827.
- Wanek, W. und Richter, A. (1993): L-iditol:NAD<sup>+</sup>5-oxidoreductase in *Viscum album*: utilization of host-derived sorbitol. *Plant Physiol. Biochem.* **31**, 205-211.
- Wang, H. L., Offler, C. E., Patrick, J. W. und Ugalde, T. D. (1994): The cellular pathway of photosynthate transfer in the developing wheat grain. I. Declination of a potential transfer pathway using fluorescent dyes. *Plant, Cell and Environment* **17**, 257-266.
- Wang, N. und Fisher, D. B. (1994): The use of fluorescent tracers to characterize the post-phloem transport pathway in maternal tissues of developing wheat grains. *Plant Physiology* **104**, 17-27.
- Weber, H., Heim, U., Borisjuk, L. und Wobus, U. (1995a): Cell-type specific, co-ordinate expression of two ADP glucose pyrophosphorylase genes in relation to starch biosynthesis during seed development of *Vicia faba*. *Planta* **195**, 352-361.
- Weber, H., Borisjuk, L., Heim, U., Buchner, P. und Wobus, U. (1995b): Seed coat associated invertases of *Fava bean* control both unloading and storage functions: cloning of cDNAs and cell type-specific expression. *Plant Cell* **7**, 1835-1846.
- Weber, H., Buchner, P., Borisjuk, L. und Wobus, U. (1996a): Sucrose metabolism during cotyledon development of *Vicia faba* L. is controlled by the concerted action of both sucrose-phosphate synthase and sucrose synthase: expression patterns, metabolic regulation and implications for seed development. *Plant J.* **9**, 841-850.
- Weber, H., Borisjuk, L. und Wobus, U. (1996b): Controlling seed development and seed size in *Vicia faba*: a role for seed coat-associated invertases and carbohydrate state. *Plant J.* **10**, 823-834.
- Weber, H., Borisjuk, L. und Wobus, U. (1997a): Sugar import and metabolism during seed development. *Trends Plant Sci.* **22**, 169-174.
- Weber, H., Borisjuk, L., Heim, U., Sauer, N. und Wobus, U. (1997b): A role for sugar transporters during seed development: molecular characterization of a hexose and a sucrose carrier in *Fava bean* seeds. *Plant Cell* **9**, 895-908.
- Wolswinkel, P. (1973): The distribution of the development of *broad bean* (*Vicia faba* L.) and the setting and growth of pods after infection by *Cuscuta* experiments about

- translocation of assimilates. Symposium on parasitic weeds, Malta- Europ. Weed Res. Council 177-1887.
- Wolswinkel, P. (1974): Complete inhibition of setting and growth of fruits of *Vicia faba*, resulting from the draining of the system by *Cuscuta* species. *Acta Bot. Neerl.* **23**, 48-60.
- Wolswinkel, P. (1977): Physiological Aspects of a parasitic relationship. The effect of *Cuscuta* on its host. Promotion Universität Utrecht.
- Wolswinkel, P. (1978): Phloem unloading in stem parts parasitised by *Cuscuta*: the release of  $^{14}\text{C}$  and  $\text{K}^+$  to the free space at  $0^\circ\text{C}$  and  $25^\circ\text{C}$ . *Physiol. Plantarum* **42**, 167-172.
- Wolswinkel, P. und Ammerlaan, A. (1983): Sucrose and hexose release by excised stem segments of *Vicia faba* L. The sucrose-specific stimulating influence of *Cuscuta* on sugar release and the activity of invertase. *J. Exp. Bot.* **34** (148), 1516-1527.
- Wolswinkel, P., Ammerlaan, A. und Peters, H. F. C. (1984): Phloem unloading of amino acids at the site of attachment of *Cuscuta europaea*. *Physiol. Plantarum* **75**, 13-20.
- Wolswinkel, P. (1985): Phloem unloading and turgor-sensitive transport: Factors involved in sink control of assimilate partitioning. *Physiol. Plant* **65**, 331-339.
- Wright, K. M. und Oparka, K. J. (1994): Physicochemical properties alone do not predict the movement and compartmentation of fluorescent xenobiotics. *J. Exp. Bot.* **45**, 35-44.
- Wright, K. M. und Oparka, K. J. (1996): The fluorescent probe HPTS as a phloem-mobile, symplastic tracer: an evaluation using confocal laser scanning microscopy. *J. Exp. Bot.* **47**, 439-445.
- Wright, K. M., Horobin, R. W. und Oparka, K. J. (1996): Phloem mobility of fluorescent xenobiotics in *Arabidopsis* in relation to their physicochemical properties. *J. Exp. Bot.* Vol **47**, 1779-1787.
- Ziegler, H. (1975): Nature of transported substances. In: Zimmermann, M. H. und Millburn, J. eds. *Encyclopedia of plant physiology*, New edn. Vol. I. Phloem transport. Berlin Springer Verlag, 59-100.

## Lebenslauf

Name: Sophie Haupt

Anschrift: 24 Bayview Road  
DD2 5DA Invergowrie  
Schottland, UK

Geburtsdatum: 31. 05. 1970

Geburtsort: Berlin

Familienstand: verheiratet

Eltern: Klaus Haupt, Rentner  
Hanna Haupt, Politologin

Schulbildung: 1977-1979 Besuch der Polytechnischen Oberschule in Berlin;  
1979-1987 Besuch der Polytechnischen Oberschule mit  
erweitertem Russischunterricht in Berlin;  
Abschluß 1987 mit "sehr gut";  
1987-1989 Besuch der Erweiterten Oberschule Max-Planck-  
in Berlin;  
Abschluß Abitur 1989 mit "Auszeichnung"

Hochschulstudium: 1989-1994 Biologiestudium an der Martin-Luther-Universität  
Halle-Wittenberg;  
Spezialisierung in der Fachrichtung Pflanzenphysiologie;  
Diplomarbeit zum Thema "Untersuchungen zum Stoffübertritt  
zwischen Wirtspflanzen und *Cuscuta reflexa* ROXB. unter  
besonderer Berücksichtigung der Free-Space-Invertase";  
1994 Diplom mit "gut"

Promotion: vom 01. 02. 1995 bis 31. 03. 1999 wissenschaftlicher  
Mitarbeiter am Institut für Pflanzen- und Zellphysiologie der  
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg;  
Mitarbeit an einem vom Land Sachsen-Anhalt geförderten  
Forschungsvorhaben (FKZ 2213A/0085G) „Charakterisierung  
der Transportvorgänge beim Stoffübertritt zwischen dem  
Holoparasiten *Cuscuta reflexa* und seinen Wirten“  
Seit 06. 04. 1999 wissenschaftlicher Mitarbeiter in der  
Arbeitsgruppe von Prof. Oparka am Scottish Crop Research  
Institute.

Halle, den

Ich möchte an dieser Stelle allen Mitarbeitern des Institutes für Pflanzen- und Zellphysiologie danken, die in irgendeiner Weise zum Entstehen der Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gebührt Frau Prof. Neumann für die Überlassung des Themas sowie für die stets gewährte Unterstützung und die kritischen Diskussionen. Weiterhin danke ich Herrn Dr. Weber am Institut für Pflanzenzüchtung und Kulturpflanzenforschung Gatersleben für die Unterstützung zur Durchführung der Enzymbestimmungen sowie Herrn Dr. Grimm für seine technische Unterstützung bei der Durchführung der Begasungsexperimente und Herrn Prof. Oparka am Scottish Crop Research Institute für die Hilfe und Unterstützung bei den in seinem Labor durchgeführten Experimenten.

Hiermit erkläre ich an Eides statt, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfaßt, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Halle, den