

# Untersuchungen zum Stofftransfer zwischen dem phanerogamen Holoparasiten *Cuscuta spec.* und seinen Wirtspflanzen

## Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät  
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Frau Mandy Birschwilks

geb. am: 12.06.1975 in: Potsdam-Babelsberg

Gutachterin bzw. Gutachter:

1. Frau Prof. Dr. St. Neumann
2. Herr Prof. Dr. N. Sauer
3. Herr Prof. Dr. G.-J. Krauß

Halle (Saale), Dezember 2003

urn:nbn:de:gbv:3-000005989

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3A3Agbv%3A3-000005989>]

---

## Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AIB	a-Aminoisobuttersäure
aqua dest.	destilliertes Wasser
AR	Aufnahmerate
BSA	Rinderserumalbumin
CF	Carboxyfluorescein
CFDA	Carboxyfluoresceindiacetat
CLSM	<i>confocale laser scanning microscopy</i>
cm	Zentimeter
cv.	cultivar (Sorte)
d	Tag(e)
DCMU	3-(3,4-Dichlorphenyl)-1,1-dimethylharnstoff; Diuron
dCTP	2'-Desoxycytidin-5'-triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dpm	<i>desintegrations per minute</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure, Chelator divalenter Kationen (z.B. Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> )
et al.	<i>et alii</i> (und andere)
FM	Frischmasse
F <sub>M</sub>	maximale Fluoreszenz
Fruc.	Fructose
F <sub>V</sub>	variable Fluoreszenz
F <sub>V</sub> / F <sub>M</sub>	max. Quantenausbeute des PS II (i.d.R. dunkeladaptierter Proben)
g	Erdbeschleunigung ( <i>gravity</i> )
g	Gramm
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
Gluc.	Glucose
h	Stunde(n)
HPTS	8-Hydroxypyren-1,3,6-Trisulfonsäure
HPTSA	8-Acetoxypyren-1,3,6-Trisulfonsäure

---

HRP	Meerrettichperoxidase ( <i>horse radish peroxidase</i> )
kDa	Kilodalton
l	Liter
LSC	Flüssigszintillationsmessung
M	Molar
MCPA	2-Methyl-4-chlorphenoxyessigsäure
mean	Mittelwert
MEN	Puffer (MOPS, EDTA, Na-Acetat)
MES	N-Morpholinoethansulfonsäure
mg	Milligramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
MOPS	3-N-Morpholinopropansulfonsäure
n	Stichprobenumfang, Anzahl der Experimente
NADH	Nicotinamidadenindinucleotiddehydrogenat
NC	Nitrocellulose
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>phosphat buffered salt</i>
PVP	Polyvinylpyrrolidin, löslich
PVPP	Polyvinylpolypyrrolidin, unlöslich
PVY <sup>N</sup>	<i>potato virus Y</i> (Kartoffelvirus Y), Stamm N
qN	nichtphotochemischer Quench der Chlorophyllfluoreszenz
qP	photochemischer Quench der Chlorophyllfluoreszenz
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>rounds per minute</i> )
RT	Raumtemperatur
Sacch.	Saccharose
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
SE	<i>standard error</i>
spec.	species (Art)

SSC	Natriumchlorid- Natriumcitrat-Puffer
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TR	Translokationsrate
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
v/v	Volumen/Volumen; Bsp.: 15%(v/v)=150ml je 1 Liter Lösung
var.	varietas (Varietät)
w/v	Masse/Volumen ( <i>weight</i> !.. ); Bsp.: 15%(w/v)=150g je 1 Liter Lösung

<b><u>1</u></b>	<b><u>Einleitung und Problemstellung</u></b>	<b><u>1</u></b>
<b><u>2</u></b>	<b><u>Material und Methoden</u></b>	<b><u>8</u></b>
<b>2.1</b>	<b>Anzucht und Kultivierung der Versuchspflanzen</b>	<b>8</b>
2.1.1	<i>Cuscuta reflexa, Cuscuta odorata, Cuscuta platyloba</i>	8
2.1.2	<i>Vicia faba, Nicotiana tabacum, Arabidopsis thaliana</i>	8
2.1.3	Etablierung der Wirt-Parasit-Systeme	8
2.1.3.1	Brücken-Infektion	9
<b>2.2</b>	<b>Translokation von radioaktiv markierten Verbindungen</b>	<b>11</b>
2.2.1	Vorbereitung des Pflanzenmaterials	11
2.2.2	Applikation radioaktiv markierten Verbindungen	12
2.2.3	Extraktion des Pflanzenmaterials und Radioaktivitätsmessung	12
<b>2.3</b>	<b>Translokation von Fluoreszenzfarbstoffen und GFP</b>	<b>13</b>
2.3.1	Farbstofflösungen	13
2.3.2	Applikation der Fluoreszenzfarbstoffe	14
2.3.2.1	CFDA und HPTSA	14
2.3.2.2	Texas red <sup>®</sup> Dextran 3000	14
2.3.3	Translokation von GFP	14
2.3.4	Konfokale <i>laser scanning</i> Mikroskopie (CLSM)	14
2.3.5	Licht- und Elektronenmikroskopie	15
2.3.5.1	Ultramikrotom	16
2.3.5.2	Kontrastierung der Präparate	16
2.3.5.3	Auswertung der Präparate	16
<b>2.4</b>	<b>Translokation von Pflanzenviren</b>	<b>16</b>
2.4.1	Inokulation von parasitierten Tabakpflanzen mit dem Kartoffelvirus Y (PVY <sup>N</sup> )	16
2.4.2	Bestimmung des Titers an PVY <sup>N</sup> -Protein durch ELISA (enzyme linked immunosorbent assay)	17
<b>2.5</b>	<b>RNA-Methoden</b>	<b>19</b>
2.5.1	RNA-Isolierung aus dem Wirt-Parasit-System <i>N. tabacum</i> cv. SNN- <i>C. reflexa</i>	19
2.5.2	Gelelektrophoretische Auftrennung von RNA	19
2.5.3	Kapillartransfer von RNA auf Nylonmembranen (Northern Blot)	20
2.5.4	Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten	20
2.5.5	Hybridisierung der RNA-tragenden Nylonmembran	20
<b>2.6</b>	<b>Nachweis von GFP über Western Blot</b>	<b>21</b>
<b>2.7</b>	<b>Translokation des Alkaloids Nicotin</b>	<b>22</b>
<b>2.8</b>	<b>Translokation von Schwermetall</b>	<b>23</b>
<b>2.9</b>	<b>Quantitative Kohlenhydratbestimmung</b>	<b>23</b>
<b>2.10</b>	<b>Verwendete radioaktive Verbindungen</b>	<b>25</b>
<b>2.11</b>	<b>Begriffsdefinitionen</b>	<b>25</b>
<b>2.12</b>	<b>Auswertung der Ergebnisse</b>	<b>26</b>
<b>2.13</b>	<b>Darstellung der mikroskopischen Ergebnisse</b>	<b>26</b>

<b><u>3</u></b>	<b><u>Ergebnisse</u></b>	<b><u>27</u></b>
<b>3.1</b>	<b>Transport aus dem Wirt in den Parasiten</b>	<b>27</b>
3.1.1	Etablierung des Wirt-Parasit-Systems <i>Vicia faba-Cuscuta reflexa</i>	27
3.1.2	Untersuchungen zur Xylemtranslokation	31
3.1.2.1	Translokation des Fluoreszenzfarbstoffs Texas red Dextran 3000	31
3.1.2.2	Translokation von Aminosäuren und Xenobiotika	31
3.1.2.3	Translokation des Schwermetalls Cadmium	40
3.1.2.4	Translokation des Alkaloids Nicotin	41
3.1.3	Untersuchungen zur Phloemtranslokation	43
3.1.3.1	Translokation von Saccharose und Xenobiotika	43
3.1.3.2	Translokation der Fluoreszenzfarbstoffe CF und HPTS	45
3.1.3.3	Translokation von Proteinen	48
3.1.3.3.1	Etablierung des Wirt-Parasit-Systems <i>Arabidopsis thaliana-Cuscuta spec.</i>	48
3.1.3.3.2	Transport von GFP	54
<b>3.2</b>	<b>Transport aus dem Parasiten in den Wirt</b>	<b>63</b>
3.2.1	Versuchssysteme	63
3.2.2	Virustransport	63
3.2.3	Transport von GFP	67
3.2.4	Transport von Saccharose	69
<b>3.3</b>	<b>Zelluläre Strukturen</b>	<b>74</b>
3.3.1	Suchhyphen	74
3.3.2	Differenzierung der Leitgewebe	80
<b><u>4</u></b>	<b><u>Diskussion</u></b>	<b><u>83</u></b>
4.1	Etablierung der Wirt-Parasit-Systeme	83
4.2	Xylemtransport	85
4.3	Phloemtransport	88
4.4	Brückenversuche	94
4.5	Zelluläre Strukturen	101
<b><u>5</u></b>	<b><u>Zusammenfassung</u></b>	<b><u>103</u></b>
<b><u>6</u></b>	<b><u>Tabellenverzeichnis</u></b>	<b><u>106</u></b>
<b><u>7</u></b>	<b><u>Literaturverzeichnis</u></b>	<b><u>111</u></b>

# 1 Einleitung und Problemstellung

Bei den Angiospermen sind mehr als 3 000 parasitisch lebende Arten bekannt (PRESS ET AL. 1990). Systematisch sind sie den Familien der Lauraceae, Santalaceae, Balanophoraceae, Rafflesiaceae, Scrophulariaceae, Orobanchaceae und Convolvulaceae innerhalb der Klasse der Dicotyledonen zuzuordnen (KOLLMANN & DÖRR 1987). Zu den Convolvulaceae gehört auch die mit ca. 279 Arten kosmopolitisch vorkommende parasitische Blütenpflanze *Cuscuta spec.*. Ihr Verbreitungsgebiet erstreckt sich in Nord-Süd-Richtung von 64° nördlicher Breite in Südgrönland (SCHMUCKER 1959) bis zu 47° südlicher Breite in Südamerika (KUIJT 1969). Vor allem in mediterranen und subtropischen Gebieten, aber auch in Mitteleuropa und Nordamerika, verursacht die Pflanze große wirtschaftliche Schäden. So ist *Cuscuta* ein ernsthaftes Problem in der Futtermittelproduktion speziell beim Anbau von Luzerne (*Medicago sativa*), Klee (*Trifolium spp.*) und Buschklee (*Lespedeza spp.*). In Kalifornien entstehen durch *Cuscuta pentagona* große Schäden beim Anbau von Tomaten (GOLDWASSER ET AL. 2001). Die in China vorkommenden Arten *Cuscuta australis* und *Cuscuta chinensis* führen zu schwerwiegenden Ernteverlusten bei Sojabohnen (*Glycine max*). Auch andere wirtschaftlich bedeutende Kulturen, wie Kartoffeln (*Solanum tuberosum*), Möhren (*Daucus carota*), Zuckerrüben (*Beta vulgaris*), Lein (*Linum usitatissimum*) werden von *Cuscuta*-Arten parasitiert (DAWSON ET AL. 1994).

Die Infektion der Anbauflächen erfolgt sehr häufig durch verunreinigtes Saatgut. Die kleinen, runden Samen mit einem Durchmesser zwischen 0,5 und 1 mm unterscheiden sich in Größe und Dichte nur wenig von Klee- und Luzernesamen. Ein Kilogramm Luzernesamen von einem befallenen Acker kann bis zu 300 000 *Cuscuta*-Samen enthalten, die auch durch modernste Methoden der Saatgutreinigung nicht entfernt werden können.

Nach Ausbringen des verunreinigten Saatgutes entwickelt sich aus den *Cuscuta*-Samen mit fett- und stärkehaltigem Endosperm eine fadenförmige Keimpflanze mit einer blattlosen oder nur mit kleinen Schuppenblättchen besetzten Sprossachse. Sie richtet sich auf und versucht durch Circumnutationen Kontakt mit einer Wirtspflanze herzustellen. Einige *Cuscuta*-Arten können während dieser präparasitischen Entwicklungsphase in geringem Umfang Photosynthese durchführen (ZIMMERMANN 1962, FER 1976a-c). Der dadurch erreichte Nährstoffgewinn ist aber nur gering, der Keimling wächst vor allem auf Kosten der hinteren Abschnitte, die allmählich vertrocknen und absterben. Gelingt der Kontakt mit einer Pflanze, umwindet der Parasit diese und bildet an den Berührungsstellen Haustorien aus, über die eine Verbindung zu den Leitgeweben hergestellt wird.

Nach erfolgreichem Anschluss erfolgt die Versorgung durch den Wirt. *Cuscuta* wird in dem Wirt-Parasit-System zum dominierenden *sink*, wirtseigene *sinks*, wie sich entwickelnde Blätter, Blüten und Früchte werden nicht mehr ausreichend versorgt, was schließlich zum Absterben der Wirtspflanzen führen kann (WOLSWINKEL 1974a). In Lupinen z.B. nimmt bei Parasitierung die Stickstofffixierung in den Knöllchen ab, da die Wurzeln nur noch unzureichend mit Kohlenstoffverbindungen aus den Blättern versorgt werden (JESCHKE ET AL. 1994b).

Das nach erfolgreichem Anschluss an die Wirtspflanze einsetzende apikale Wachstum von bis zu 7 cm pro Tag und die Ausbildung zahlreicher Verzweigungen führen zu einer schnellen Ausbreitung auf benachbarte Pflanzen, wo erneut Haustorien ausgebildet werden. Bei fortschreitender Parasitierung sind die Kulturpflanzen völlig von den „Fäden“ des Parasiten überwuchert, der deswegen im Deutschen als „Teufelszwirn“ bzw. wegen seines dünnen, fädigen Aussehens auch als „Kleeseide“ bezeichnet wird.

Während von den Dicotyledonen ein breites Wirtsspektrum bekannt ist (DAWSON ET AL. 1994), sind von den Monocotyledonen bisher nur Zwiebel (*Allium cepa*) und Spargel (*Asparagus officinales*) als kompatible Wirtspflanzen beschrieben worden (ASHTON & SANTANA 1976). Süßgräser (Poaceae), zu denen auch die bekannten Getreidearten und Reis gehören, werden nicht parasitiert (MARAMBE ET AL. 2002).

*Cuscuta* ist morphologisch und physiologisch an die Lebensweise als Holoparasit angepasst. Die ganze Pflanze besteht nur noch aus langen fädigen, sich stark verzweigenden wurzellosen Achsen. Die Blätter sind zu kleinen rudimentären schuppenähnlichen Organen zurückgebildet. Hinsichtlich der Farbe der Achse und der Schuppenblättchen reicht die Skala bei den einzelnen *Cuscuta*-Arten von hellgrün (z.B. *Cuscuta reflexa*) über gelblich (z.B. *Cuscuta platyloba*) bis farblos (z.B. *Cuscuta odorata*).

In einigen *Cuscuta*-Arten ist Chlorophyll nachweisbar: *C. pentagona* (ZIMMERMANN 1962, PIZZOLONGO 1963, 1964, SHERMAN ET AL. 1999), *C. subinclusa*, *C. gronovii* (VAN DER KOOIJ ET AL. 2000), *C. santapau* (JANARDHANARAO ET AL. 1984), *C. campestris* (MACLEOD 1962, 1963, VAN DER KOOIJ ET AL. 2000), *C. santapau* (JANARDHANARAO ET AL. 1984), *C. reflexa* (MACLEOD 1962, MISRA ET AL. 1970, MACHADO & ZETSCHKE 1990, PANDA & CHOUDHURY 1992, HIBBERD ET AL. 1998, CHOUDHURY & SAHU 1999, VAN DER KOOIJ ET AL. 2000) und *C. lupiliformis* (FER 1979).

Für *Cuscuta pentagona* (PIZZOLONGO 1964, SHERMAN ET AL. 1999), *Cuscuta australis* (LAUDI ET AL. 1974) und *Cuscuta reflexa* (MACHADO & ZETSCHKE 1990) liegen auch elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Ultrastruktur der Chloroplasten vor. Die Chloroplasten von *Cuscuta reflexa* sind mit einer Breite von 0,73  $\mu\text{m}$  und einer Länge von ca. 4  $\mu\text{m}$  wesentlich kleiner als die Chloroplasten von  $\text{C}_3$ -Pflanzen, deren Größe zwischen 6-8  $\mu\text{m}$  liegt. Die Grana werden durchschnittlich nur aus 3-4 Thylakoiden gebildet. Die Chloroplasten enthalten Stärke und Lipidtropfen (BIRSCHWILKS 2001).

Die mehr oder weniger farblos erscheinenden Arten *Cuscuta europaea* (MACHADO & ZETSCHKE 1990), *Cuscuta odorata* und *Cuscuta grandiflora* (VAN DER KOOIJ ET AL. 2000) enthalten weder messbare Mengen an Chlorophyll noch Thylakoidstrukturen in den Chloroplasten.

Obwohl *Cuscuta reflexa* innerhalb der untersuchten Arten den höchsten Chlorophyllgehalt aufweist, ist er im Vergleich zu dem der Wirtspflanzen jedoch außerordentlich gering. Parasitierende Achsen enthalten nur 3,2 % der in den Blättern der Wirtspflanze *Pelargonium zonale* vorliegenden Chlorophyll- bzw. 9 % der Carotinoidmenge (BIRSCHWILKS 2001).

Fluoreszenzmessungen ergaben jedoch keine Abweichungen von den für nicht parasitisch lebende Pflanzen charakteristischen Kinetiken. Mit zunehmender Lichtintensität wurde eine Zunahme von  $q_N$  und eine Abnahme von  $q_P$  gemessen. Die maximale Quantenausbeute des

PSII, ausgedrückt durch das Verhältnis von  $F_v/F_m$ , ist mit 0,754 (BIRSCHWILKS 2000) niedriger als das  $F_v/F_m$ -Verhältnis Höherer Pflanzen, das zwischen 0,82 und 0,88 schwankt (SCHREIBER ET AL 1994). Die Achsen enthalten auch geringe Mengen an Rubisco (HIBBERD ET AL 1998, VAN DER KOOIJ ET AL 2000, BIRSCHWILKS 2000). Damit sind in *Cuscuta reflexa* sowohl strukturelle als auch physiologische Voraussetzungen für die Photosynthese vorhanden. Sie spielt aber bei parasitierenden Achsen als Nährstoffquelle keine Rolle, der Substanzgewinn ist außerordentlich gering (HIBBERD ET AL 1998). In ungünstigen Ernährungssituationen, bei fehlendem Wirtkontakt oder ungenügender Nährstoffzufuhr aus dem Wirt, kann die Photosyntheseaktivität durch Zunahme der Photosynthesepigmente und der Menge an Rubisco zwar kurzfristig ansteigen, für ein wirtsunabhängiges Leben reicht sie aber nicht aus (BIRSCHWILKS 2001).

*Cuscuta* ist auf eine Assimilatversorgung durch den Wirt angewiesen. Strukturelle Grundlage dafür ist die Ausbildung funktioneller Leitbündelverbindungen zwischen Wirt und Parasit über Haustorien. Dieser Prozess, an dem Phytochrom (LANE & KASPERBAUER 1965, TADA ET AL 1996, FURUHASHI ET AL 1997, HAIDAR ET AL 1997) und Hormone, insbesondere Auxin und Cytokinin, beteiligt sind (PALIYATH ET AL 1978, RAMASUBRAMANIAN ET AL 1988, RAJAGOPAL ET AL 1988, LÖFFLER ET AL 1999), wird ausgelöst durch mechanische Reizung der Parasitenachse beim Umwinden der Wirtsorgane (TADA ET AL 1996, HAIDAR ET AL 1997, 1998, IHL & WIESE 2000).

Nach KOLLMANN & DÖRR (1987) verläuft die Haustorienentwicklung in drei Phasen: (1) Kontaktaufnahme, (2) Eindringen des Parasiten in das Wirtsgewebe und Ausbildung der Suchhyphen und schließlich (3) die Umdifferenzierung der Suchhyphen zu Kontakthyphen und Verbindung der Leitgewebe von Wirt und Parasit.

Die erste Phase, die Kontaktaufnahme, erfolgt durch die Ausbildung von Prähaustorien. Dabei strecken sich die Epidermiszellen des Parasiten und differenzieren sich zu einem sekretorischen Epithel, das eine elektronendichte Substanz ausscheidet, mit der die Oberflächen von Wirt und Parasit „aneinander geklebt“ werden (HEIDE-JORGENSEN 1987,1991, LEE & LEE 1989, VAUGHN 2002). Mit Antikörpern konnte gezeigt werden, dass diese „zementartige“ Schicht aus unveresterten Pectinen gebildet wird (VAUGHN 2003).

Durch tangential und radiale Teilungen entsteht im Rindengewebe von *Cuscuta* die Anlage des Haustoriums, das als geschlossener Zapfen in das Wirtsgewebe eindringt (DÖRR 1968). Das Vordringen der Parasitenzellen im Wirtsgewebe stellt eine Kombination aus einfachen Druckmechanismen und enzymatischen Prozessen dar. Elektronenmikroskopisch sind im Bereich der Mittellamellen der Wirtspflanzen Auflösungserscheinungen erkennbar. Für eine Beteiligung von Enzymen an diesem Prozess spricht die nachgewiesene hohe Aktivität von Pectinesterase, Polygalacturonase und Exo-1,4-D-Glucosidase (NAGAR ET AL 1984, SRIVASTAVA ET AL 1994).

Die zusammengedrückten Rinden- und Epidermiszellen des Wirtes sind im Fluoreszenzmikroskop als dichte, grünfluoreszierende, seitliche Begrenzung des Haustoriums erkennbar. In tieferen Schichten des Wirtsparenchyms entstehen durch Aufgliederung des apikalen Haustorialbereiches einzelne hyphenartige Zellstränge, die sog. Suchhyphen. Sie sind stets einzellig, können bis zu 800  $\mu\text{m}$  lang werden (VAUGHN 2003) und wachsen in alle

Richtungen. Dabei ist sowohl ein Durchwachsen von Parenchymzellen (intrazelluläres Wachstum) aber auch ein Wachstum zwischen zwei Zellwänden des Wirtes zu beobachten (interzelluläres Wachstum).

Suchhyphen sind stets von der eigenen und von der Zellwand des Wirtes umgeben. In den Wänden befinden sich Plasmodesmen, über die die Protoplasten von Wirt und Parasit in Verbindung stehen (SCHUMACHER & HALBSGUTH 1938, LAMBERTZ 1954, DÖRR 1968a, 1969, 1987, VAUGHN 2003). Sobald die Leitgewebe des Wirtes erreicht werden, entwickeln sich die Haustorialzellen, die an das Xylem stoßen, zu wasserleitenden Elementen, indem lignifizierte ring- und netzförmige Wandverdickungen ausgebildet werden. Die einzelnen Glieder des Xylems bestehen aus Tracheen und Tracheiden. Sie stehen untereinander und mit den Xylemelementen des Wirtes in offener Verbindung.

Bei Phloemkontakt legt sich das Ende der Suchhyph nach elektronenmikroskopischen Studien von DÖRR (1972) wie die „Finger einer Hand“ um die Wirtssiebröhre und bildet einen „Absorptionsfuß“. Die Suchhyph erfährt eine umfangreiche strukturelle Differenzierung, nach deren Abschluss sie sowohl charakteristische Merkmale einer Transferzelle als auch eines Siebelementes aufweist. Im Kontaktbereich zur Wirtssiebröhre wird die Zelloberfläche durch Ausbildung zahlreicher Wandprotuberanzen um das zwanzigfache vergrößert (DÖRR 1972). Das aufgelockerte Grundplasma enthält ein hochentwickeltes Endomembransystem; Zellkern, Tonoplastenmembran und Ribosomen fehlen. Die an die Kontakthyphe anschließenden Parasitenzellen differenzieren sich zu Siebelementen und Geleitzellen (DÖRR 1990). Die Anlage einer durchgehenden Verbindung vom Phloem des Wirtes bis zur Kontakthyphe erfolgt dabei offensichtlich von beiden Seiten. Im basalen Teil des Haustoriums, in unmittelbarer Nähe zu den Leitbündeln des Parasiten, ist bereits in frühen Stadien der Haustorienentwicklung, bevor ein Kontakt zum Leitgewebe des Wirtes besteht, eine Differenzierung in Siebelemente erkennbar (DÖRR 1990).

Trotz umfangreicher elektronenmikroskopischer Studien, besonders im Wirt-Parasit-System *Pelargonium zonale-Cuscuta odorata* konnten bisher an der Kontaktstelle zwischen Wirtssiebröhre und Kontakthyphe keine plasmatischen Verbindungen nachgewiesen werden (DÖRR 1996).

Nach Ausbildung der funktionellen Leitbündelverbindung erfolgt eine völlige Umoorientierung der bisherigen Assimilatverteilungsmuster in der Wirtspflanze (JACOB & NEUMANN 1968, WOLSWINKEL 1974a). Der Wirt reagiert auf die Infektion und den durch *Cuscuta* entstandenen neuen *sink* mit einer Steigerung der Photosynthese (JESCHKE ET AL 1994b, JESCHKE ET AL 1997, JESCHKE & HILPERT 1997). Interessanterweise bleibt der hohe Stoffentzug durch *Cuscuta* auch dann erhalten, wenn der Parasit schrittweise bis auf die Haustorien im Wirtsgewebe verkürzt wird (JACOB & NEUMANN 1968, HAUPT 2001).

*Cuscuta* bezieht über das Phloem nicht nur die für Wachstum und Stoffwechsel notwendigen Substanzen. In zahlreichen Experimenten konnte vielmehr gezeigt werden, dass auch für den Parasiten nicht verwertbare oder seinen Stoffwechsel schädigende Verbindungen aus dem Wirt in *Cuscuta* gelangen. Das gilt u.a. für die in den Blättern von *Genista acantholacada* bzw. *Lupinus albus* synthetisierten Chinolizidin-Alkaloide (BÄUMEL ET AL 1993, 1995, WINK & WITTE 1993) für *Digitalis*-Glycoside (GRIMMER ET AL 1958, ROTHE ET AL 1999), für die

in den Wirtspflanzen *Albizzia lophanta* und *Cannavalia ensiformis* synthetisierten seltenen Aminosäuren Pipecolinsäure, OH-Pipecolinsäure, Canavanin (STROBEL 1967) und für Wirkstoffe von zahlreichen Pflanzenschutzmitteln (BIGALKE 1974, JAHNKE 1975, FER & CHAMEL 1983).

Die Entladung von Substanzen aus dem Phloem kann prinzipiell auf zwei Wegen erfolgen: symplastisch oder apoplastisch (PATRICK 1990). Bei der symplastischen Entladung, wie sie in jungen Blättern (TURGEON 1987, SCHMALSTIG & GEIGER 1985, HAUPT ET AL. 2001b) und Wurzelspitzen (SCHULZ 1995, OPARKA ET AL. 1994) erfolgt, sind Leitgewebe und *sink*-Gewebe über Plasmodesmen, deren Ausschlussgrößen bis zu 50 kDa betragen können, verbunden.

Bei der apoplastischen Entladung, die bevorzugt in Speichergeweben stattfindet, fehlen plasmatische Verbindungen zwischen Leitgewebe und *sink*. Die Substanzen werden aus dem Siebröhren-Geleitzellen-Komplex zunächst in den Apoplasten abgegeben und von dort über spezifische Carrier in die *sink*-Zellen aufgenommen.

Der Mechanismus der Phloementladung in *sinks*, die durch Parasiten in Höheren Pflanzen induziert werden, konnte bisher nur in wenigen Fällen aufgeklärt werden. Symplastisch erfolgt die Entladung in die durch Infektion mit *Agrobacterium tumefaciens* gebildeten Tumoren an *Kalanchoë daigremontiana* und *Ricinus communis* (PRADEL ET AL. 1996). Auf apoplastischem Weg dagegen gelangen die Assimilate aus den Leitgeweben der Blätter von *Hordeum distichum* in die Pilzhypen des Rostpilzes *Puccinia hordeii* (TETLOW & FARRAR 1993) und in den an *Arabidopsis*-Wurzeln parasitierenden Nematoden *Heterodera schachtii* (BÖCKENHOFF & GRUNDLER 1994, BÖCKENHOFF ET AL. 1996).

Für Wirt-Parasit-Systeme mit *Cuscuta spec.* gelten der bisher fehlende Nachweis von plasmatischen Verbindungen zum Phloem des Wirtes und die in der Kontakthyphe beobachtete, für Transferzellen charakteristische Oberflächenvergrößerung als wesentliche Argumente für einen apoplastischen Transfer der Substanzen aus dem Phloem des Wirtes in den Parasiten (WOLSWINKEL 1977, WOLSWINKEL & AMERLAAN 1983, KOLLMANN & DÖRR 1987, JESCHKE ET AL. 1994a, b, CHRISTENSEN ET AL. 2003).

Der apoplastische Transfer umfasst folgende Teilprozesse und erfordert zwei Membranpassagen:

- Efflux der im Phloem des Wirtes transportierten Verbindungen in den gemeinsamen Apoplasten von Wirt und Parasit (erste Membranpassage)
- Diffusion der Substanzen durch den Apoplasten, wobei z.B. eine Spaltung von Saccharose durch extrazelluläre Invertase in Glucose und Fructose denkbar ist
- Aufnahme der Substanzen aus dem Apoplasten in die Kontakthyphe des Parasiten (zweite Membranpassage).

Eine kritische Sichtung der vorliegenden Ergebnisse macht einen apoplastischen Übergang trotz des fehlenden Nachweises der strukturellen Voraussetzungen aber eher unwahrscheinlich.

*Cuscuta* parasitiert die Assimilatleitbahnen des Wirtes entlang des *path*. Die Druckstromhypothese von MÜNCH (1930) setzt voraus, dass die Siebröhren entlang des Transportweges völlig dicht sind und kein Transport von Substanzen in das umgebende Gewebe stattfindet, um die für den Transport zwischen *source* und *sink* notwendige Turgordifferenz aufrechtzuerhalten. Zwischen dem Siebröhren-Geleitzellen-Komplex und den Phloemparenchymzellen sind nur wenige Plasmodesmen ausgebildet. In Siebelemente injizierte Farbstoffe zeigen einen longitudinalen Transport in den Siebelementen und einen Eintritt in die Geleitzellen, aber keinen Übertritt in die Phloemparenchymzellen (VAN BEL & KEMPERS 1991). Neben der Retention der Substanzen in den Siebröhren hat der *path* aber auch die Aufgabe, das umliegende Gewebe entlang der Transportstrecke mit Nährstoffen zu versorgen. Das erfolgt über einen kontrollierten *release-retrieval*-Mechanismus. Dieser beinhaltet einen passiven Efflux der Substanzen aus dem Phloem und ihre aktive Wiederaufnahme über spezifische Carrier. Nach Untersuchungen von MINCHIN & THORPE (1987) beträgt der Nettoverlust an transportierter Saccharose pro cm Transportstrecke 2,8 %. 6 % treten pro cm durch Efflux aus, 3,4 % werden durch Carrier zurückgepumpt.

Bei einem apoplastischen Transfer der Substanzen müsste der Nettoefflux an der Kontaktstelle zwischen Wirt und Parasit erhöht werden. Das wäre denkbar durch eine Hemmung der für die Wiederaufnahme verantwortlichen Carrier. Diese sind aber sicher nur für die biotischen im Phloem transportierten Substanzen, wie Saccharose und Aminosäuren, vorhanden, nicht aber für die ebenfalls in den Parasiten gelangenden Xenobiotika. Für Saccharose wäre eine Erhöhung des Efflux auch vorstellbar, wenn das aus dem Phloem austretende Disaccharid durch extrazelluläre Invertase gespalten wird (ESCHRICH 1980). Glucose und Fructose müssten dann über spezifische Carrier in die Kontakthyphe aufgenommen werden. Dafür liegen aber bisher keine experimentellen Beweise vor. Alle Untersuchungen sprechen vielmehr dafür, dass Saccharose ungespalten aus dem Wirt in den Parasiten übertritt und Invertase an diesem Vorgang nicht beteiligt ist (TSIVION 1978, BOUYA 1986, SAMODELKIN 1990, DE BOCK 1990, NEUMANN & HAUPT 1996).

Befürworter eines apoplastischen Transfers stützen sich auch auf Ergebnisse von WOLSWINKEL (1974b, 1975) und WOLSWINKEL & AMERLAAN (1983), die in Auswaschversuchen mit parasitierten Internodiensegmenten von *Vicia faba* einen erhöhten Efflux von Aminosäuren, Saccharose,  $K^+$  und  $Mg^{2+}$  gegenüber nicht parasitierten Achsenabschnitten feststellten. Entgegen gebräuchlicher Auswaschzeiten von wenigen Minuten zur Erfassung der Substanzen im freien Raum (GRIMM ET AL. 1990), wurde in diesen Experimenten über 90 min ausgewaschen, so dass sicher auch aus dem Symplasten nachströmende Anteile mit erfasst wurden. SAMODELKIN (1990) konnte die Ergebnisse nicht bestätigen. WOLSWINKEL (1977) fand auch eine Erhöhung des Effluxes in Abschnitten ober- und unterhalb der Parasitierung und zog daraus den Schluss, dass für die Erhöhung des Effluxes ein direkter Kontakt mit Parasitenzellen offensichtlich nicht notwendig ist.

HAUPT (2001) konnte jedoch zeigen, dass der Stofftransfer sowohl für biotische als auch für xenobiotische Substanzen ganz lokal an der Kontaktselle zwischen Wirt und Parasit erfolgt. Mit einer apoplastischen Passage sind auch die in der Literatur vorliegenden Ergebnisse über die Übertragbarkeit von Phytoplasmen (HEINTZ 1989, KAMINSKA & KORBIN 1999) und Viren durch *Cuscuta*-Arten nicht vereinbar (BENNETT 1944a, b, HOSFORD 1967, HAUPT 2001).

Die systemische Ausbreitung von Viren in der Pflanze kann nur durch einen Zell-Zell-Transport über Plasmodesmen und über das Phloem erfolgen. Dabei werden die Ausschlussgrößen der Plasmodesmen mit Hilfe eines von den Viren synthetisierten *movement protein* erweitert (NELSON & VAN BEL 1998, LUCAS & GILBERTSON 1994). Ein weiterer Hinweis auf einen symplastischen Transfer ist der von HAUPT ET AL. (2001a) nachgewiesene Transport des 27 kDa großen *green fluorescent protein* (GFP) im Wirt-Parasit-System *Nicotiana tabacum* cv. Sumsai-*Cuscuta reflexa*. Nach Ansicht von CHRISTENSEN ET AL. (2003) spiegelt dieses Ergebnis aber nur die speziellen Verhältnisse in dem untersuchten Wirt-Parasit-System wieder, eine Übertragung auf andere Wirt-Parasit-Systeme oder gar eine Verallgemeinerung sei nicht möglich.

Eine Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es daher, an unterschiedlichen Wirt-Parasit-Systemen weitere Beweise für einen symplastischen Transfer aus dem Phloem des Wirtes in das Phloem des Parasiten zu erbringen. Als Wirtspflanzen wurden *Vicia faba* sowie Wildtypen und transgene Pflanzen verschiedener Kultivare von *Nicotiana tabacum* und *Arabidopsis thaliana* verwendet, die mit drei unterschiedlichen *Cuscuta*-Arten, *Cuscuta reflexa*, *Cuscuta platyloba* und *Cuscuta odorata*, parasitiert wurden.

Mit diesen Wirt-Parasit-Systemen sollte in einem weiteren Teil der Arbeit auch untersucht werden, in welchem Stadium der Haustorienentwicklung und in welchem Umfang ein Transport vom Parasiten in den Wirt erfolgt. Außer den Hinweisen auf eine Übertragbarkeit von Viren zwischen zwei Wirtspflanzen durch *Cuscuta* liegen darüber bisher keine Ergebnisse in der Literatur vor.

Die experimentellen Arbeiten konzentrierten sich auf folgende Schwerpunkte:

- Untersuchungen zur Selektivität des Übertritts von Substanzen aus dem Wirt in den Parasiten durch gleichzeitige Applikation von Saccharose und Xenobiotika an die Wirtspflanze
- Untersuchungen zur Translokation der als Marker für einen symplastischen Transport geltenden Fluoreszenzfarbstoffe 5(6)-Carboxyfluorescein (CF) und 8-Hydroxypyren-1,3,6-trisulfonsäure (HPTS)
- Untersuchungen zum Transport des Kartoffelvirus PVY<sup>N</sup>
- Untersuchungen zum Proteintransport am Beispiel von GFP und GFP-Ubiquitin
- Untersuchungen zum Umfang des Transports von Saccharose, GFP und PVY<sup>N</sup> aus dem Parasiten in den Wirt durch sog. Brückeninfektionen
- Untersuchungen zum Umfang und zur Selektivität des Xylemtransports
- Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen der zellulären Strukturen für einen Stofftransfer zwischen Wirt und Parasit.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Anzucht und Kultivierung der Versuchspflanzen

#### 2.1.1 *Cuscuta reflexa*, *Cuscuta odorata*, *Cuscuta platyloba*

*Cuscuta reflexa* ROXB., *Cuscuta odorata* RUIZ & PAVON und *Cuscuta platyloba* PROGEL werden im Gewächshaus des Instituts für Pflanzenphysiologie als Stammkultur auf *Pelargonium zonale* als Wirtspflanze vegetativ vermehrt und erhalten. Die Ausgangsachsen für die seit 1961 bestehende Kultur von *C. reflexa* wurden 1959 von O.H. Volk (Würzburg) aus Afghanistan eingeführt. Ausgangsachsen für die Kultur von *C. odorata* wurden 1989 von I. Dörr aus dem Botanischen Institut der Universität Kiel, für die Kultur von *C. platyloba* 1991 von P. Proksch vom Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie der Universität Würzburg erhalten.

Eine ganzjährige Haltung unter Langtagbedingungen (16 h Licht, 8 h Dunkel) verhindert das Blühen der Kultur. Von November bis März erfolgt eine Zusatzbeleuchtung mit Quecksilberhochdruckdampflampen (HQL 250, Berliner Glühlampenwerke).

Luftfeuchte und Temperatur entsprechen im Sommerhalbjahr den natürlich gegebenen Bedingungen. Im Winterhalbjahr schwankt die Temperatur zwischen 18-25°C, die Luftfeuchte liegt zwischen 60-80 %.

#### 2.1.2 *Vicia faba*, *Nicotiana tabacum*, *Arabidopsis thaliana*

Als Wirtspflanzen wurden Wildtypen und transgene Pflanzen unterschiedlicher Kultivare von *Vicia faba* L. (Ackerbohne, *Fabaceae*), *Nicotiana tabacum* L. (Tabak, *Solanaceae*) und *Arabidopsis thaliana* (L.) HEYNH. (Ackerschmalwand, *Brassicaceae*) verwendet. Ihr Einsatz war abhängig von der zu untersuchenden Fragestellung (Tab. 2-1).

Die Pflanzen wurden aus Samen in einem Erde-Vermiculit-Gemisch (3:1) unter Kurztagbedingungen (9 h Kunstlicht, 15 h Dunkel, 20°C) angezogen. *Arabidopsis thaliana* wurde zur Ausbildung der Blütenstandsachsen unter Langtagbedingungen (16 h Kunstlicht, 8 h Dunkel; 21°C) kultiviert.

#### 2.1.3 Etablierung der Wirt-Parasit-Systeme

Für die Parasitierung der Wirtspflanzen mit *Cuscuta reflexa* wurden von der Stammkultur abgetrennte Sprossachsen verwendet. Die isolierten Achsen waren 21 cm lang und im Durchschnitt 4 mm dick. Die Infektion erfolgte in allen Fällen im „parallelen Induktionsmodus“. Dabei wird das natürliche Linkswinden des Parasiten um den Wirt unterdrückt und eine Anordnung der sich bildenden Haustorien ausschließlich an einer Flanke des zu parasitierenden Organs (Sprossachse, Blattstiel bzw. Blütenstandsachse) erzwungen.

Zur Ausbildung der Haustorien ist nur der zwischen 1 und 6 cm von der Spitze entfernte Achsenabschnitt („kontaktreizbarer Abschnitt“) in der Lage. Er wird mit Hilfe eines inerten Klebebandes an einer Flanke des zu parasitierenden Organs (Sprossachse, Blattstiel, Blütenstandsachse) befestigt und leicht angedrückt. Oberhalb entstehende Windungen wurden vorsichtig abgelöst.

Innerhalb von 10-14 Tagen erfolgte die Ausbildung von in einer Reihe untereinander angeordneten Haustorien. Der erfolgreiche Anschluss des Parasiten ist auch an Saccharose-Ausscheidungen aus den extrafloralen Nektarien und einem deutlichen Längenzuwachs der Achse erkennbar (3-4 cm/d).

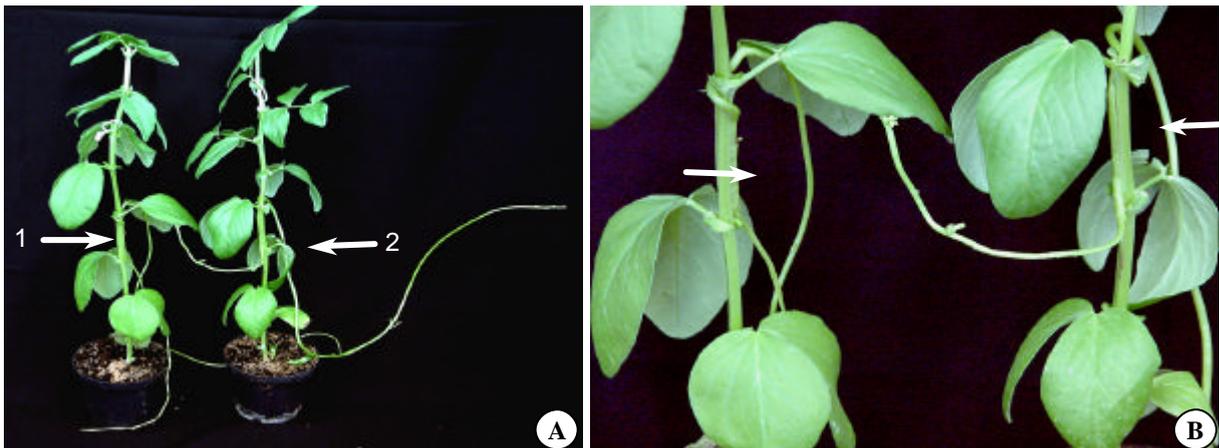
Zur Parasitierung der *Arabidopsis*-Pflanzen mit *Cuscuta odorata* und *Cuscuta platyloba* wurden von der Stammkultur abgetrennte Achsen zunächst auf *Vicia faba* kultiviert und von dort auf *Arabidopsis*-Blütenstandsachsen übergeleitet. Bis zur Ausbildung der Haustorien, die für beide Arten nur im gewundenen Induktionsmodus erfolgte, blieben die Achsen in Kontakt mit den *Vicia*-Pflanzen.

#### **2.1.3.1 Brücken-Infektion**

Diese Versuchsanordnung wurde für die Untersuchung der Translokation von Viren, GFP, CF und radioaktiv markierter Saccharose von einer Wirtspflanze in eine zweite benutzt. Dabei wurden jeweils zwei Pflanzen von *Nicotiana tabacum* L. cv. SNN (Translokation von Viren), *Arabidopsis thaliana* (Translokation von GFP) bzw. *Vicia faba* (Translokation von Saccharose und CF) über eine *Cuscuta reflexa*-Achse miteinander verbunden.

Die Parasitierung der ersten Pflanze erfolgte bei *Nicotiana* an den Blattstielen der unteren *source*-Blätter, die der zweiten an der Sprossachse wie unter 2.1.3 beschrieben. Bei *Arabidopsis* wurde jeweils die Blütenstandsachse, bei *Vicia* das zweite oder dritte Internodium parasitiert. Nach erfolgreichem Anschluss an die erste Wirtspflanze, in der Regel nach 10-14 Tagen und einer Länge der freien *Cuscuta*-Achse von ca. 20 cm, wurde der kontaktreizbare Abschnitt an der zweiten Wirtspflanze mit Klebeband zur Haustorienausbildung fixiert.

Die Abb. 2-1 zeigt ein Beispiel für ein *Vicia*-Brückensystem.



**Abb. 2- 1: Brückensystem**

In Abb. 2-1A ist ein Brückensystem für *Vicia faba*, in Abb. 2-1B eine Ausschnittsvergrößerung der Haustorialregionen dargestellt. Die Pfeile markieren das durch *Cuscuta reflexa* parallel parasitierte Internodium der ersten bzw. zweiten *Vicia faba*-Pflanze.

**Tab. 2- 1: Wirtspflanzen für *Cuscuta spec.* und untersuchte Fragestellungen**

Wirtspflanze		untersuchte Fragestellung
<i>Vicia faba</i> cv. Dreifach Weiße	Wildtyp	Phloemtransfer von Saccharose, Xenobiotika und Fluoreszenzfarbstoffen; Xylemtransfer von Xenobiotika, Fluoreszenzfarbstoffen und Schwermetallen; licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen des Haustorienanschlusses
<i>Vicia faba</i> var. <i>minor</i> cv. Fribo		
<i>Nicotiana tabacum</i> cv. Samsun NN (SNN)	Wildtyp	Translokation von Alkaloiden und Viren
<i>Nicotiana tabacum</i> cv. Sumsai <sup>1</sup>	AtSUC2-GFP (27 kDa)	Phloemtransfer von GFP
<i>Nicotiana tabacum</i> cv. xanthi <sup>2</sup>	TMV MP-GFP	ultrastrukturelle Untersuchung der Suchhyphen
<i>Arabidopsis thaliana</i> cv. Columbia	Wildtyp	siehe <i>Vicia faba</i>
<i>Arabidopsis thaliana</i> cv. C24 <sup>3</sup>	AtSUC2-GFP (27 kDa)	Phloemtransfer von GFP und GFP-Fusion
	AtSUC2-GFP-Ubiquitin (35,5 kDa)	

Die Samen (1+3) wurden uns von Prof. N. Sauer (Molekulare Pflanzenphysiologie, Universität Erlangen), die Samen (2) von C. Reichel (GPC Biotech AG, Martinsried) freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

## 2.2 Translokation von radioaktiv markierten Verbindungen

### 2.2.1 Vorbereitung des Pflanzenmaterials

Bei *Vicia faba* wurden aus erfolgreich parasitierten Pflanzen (Abb. 2-2A) 24 h vor Versuchsbeginn Explantate hergestellt. Sie bestanden bei Experimenten zur Xylemtranslokation aus dem im parallelen Induktionsmodus parasitierten Internodium, dem unmittelbar oberhalb der Parasitierungsstelle befindlichen Fiederblatt und dem darauffolgenden Internodium mit dem daran inserierten Fiederblatt (Abb. 2-2B). Unterhalb der Infektionsstelle wurden alle Blätter entfernt und nur ca. 7 cm Achse belassen. Bei Experimenten zur Phloemtranslokation wurde nur das Fiederblatt oberhalb der Parasitierungsstelle belassen, das an der infizierten Flanke inseriert war (Abb. 2-2C). Bei Ansatz der Blüten wurden die *Vicia*-Pflanzen dekapitiert (Abb. 2-2A).

Die Explantate wurden unmittelbar nach der Präparation mit der unteren Schnittfläche in eine Lösung von 10 mM EDTA/10 mM MES-NaOH (pH 5) gestellt. Dadurch sollte eine Unterbrechung des Phloemstromes durch Verschließen der verwundeten Siebröhren verhindert werden (KING & ZEEVAART 1974). Nach 30 min wurde die Lösung gegen eine EDTA-freie gleicher Konzentration und gleichen pH-Wertes ausgetauscht.

Bei *Arabidopsis* wurden 24 h vor Versuchsbeginn alle Rosettenblätter bis auf vier entfernt. Die Seitentriebe der Blütenstandsachse wurden schon während der Parasitierung entfernt, so dass sich nur noch vereinzelt Blätter an der Blütenstandsachse befanden.

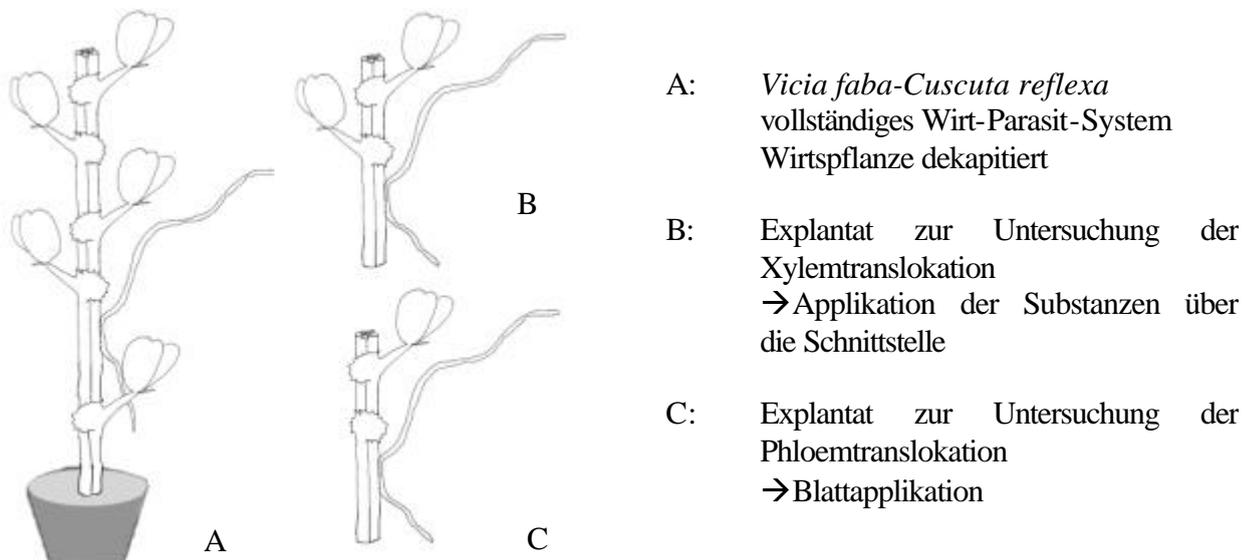


Abb. 2-2: Schematische Darstellung der Explantate für Translokationsuntersuchungen

### 2.2.2 Applikation radioaktiv markierter Verbindungen

Bei Untersuchungen zur Phloemtranslokation wurden 20 µl einer Lösung definierter Konzentration der zu untersuchenden Substanz in 10 mM MES-NaOH (pH 5) auf die Oberfläche einer Blatffieder bei *Vicia faba* bzw. der Rosettenblättchen bei *Arabidopsis thaliana* als kleine Tröpfchen aufgetragen. Um eine bessere Aufnahme zu gewährleisten, wurde die Applikationsstelle mit feinem Sandpapier leicht angeraut und regelmäßig mit Puffer (10 mM MES-NaOH (pH 5)) nachbefeuchtet. Explantate von *Vicia faba* standen während der gesamten Versuchsdauer in einer Lösung von 10 mM MES-NaOH (pH 5).

Die Applikation der radioaktiv markierten Substanzen bei Experimenten zur Xylemtranslokation erfolgte bei *Vicia faba* entweder durch Einstellen der sorgfältig freigespülten Wurzeln oder der unteren Schnittflächen der Explantate in Lösungen definierter Konzentration.

### 2.2.3 Extraktion des Pflanzenmaterials und Radioaktivitätsmessung

Nach Ablauf der Translokationszeit wurden die Wirt-Parasit-Systeme in definierte Abschnitte zerteilt und diese mit Hilfe einer Rasierklinge grob zerkleinert.

Die Extraktion des Pflanzenmaterials erfolgte mit Methanol. Alle Proben wurden über Nacht unter Schütteln extrahiert.

Durch Flüssigszintillationsmessung (LS 6000, Beckman Instruments Inc., Fullerton, USA) erfolgte die Quantifizierung des Radioaktivitätsgehaltes der Extrakte. Hierfür wurden die Proben mit 7,5 ml Szintillator/5 ml Probe versetzt. Der Szintillator ist ein Toluol-Cocktail aus PPO und POPOP (4 g 2,5-Diphenyloxazol (PPO), 0,24 g 2,2-p-Phenyl-bis-5-Phenyloxazol (POPOP) auf 1 l Toluol).

Die Versuche mit doppelt markierten Proben ( $^3\text{H}$  und  $^{14}\text{C}$ ) setzen für eine korrekte Flüssigszintillationsmessung einen mindestens vierfach höheren Anteil an dem Isotop  $^3\text{H}$  voraus.

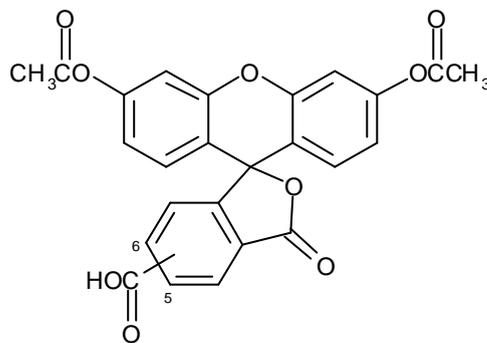
Das Pflanzenmaterial verblieb während der Messung in der Probe. Dadurch konnten, wie Vorversuche zeigten, auch durch Methanol nicht extrahierbare Verbindungen bei der Messung erfasst werden.

## 2.3 Translokation von Fluoreszenzfarbstoffen und GFP

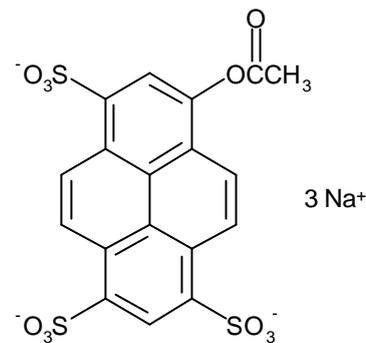
### 2.3.1 Farbstofflösungen

Für die Markierung des Phloemtransportweges und die symplastische Entladung wurden die phloemmobilen Fluoreszenzfarbstoffe Carboxyfluorescein (CF) und Hydroxypyrentrisulfonsäure (HPTS) in ihren Esterformen CFDA und HPTSA verwendet.

- CFDA= 5(6)-Carboxyfluorescein-diacetate, Molecular Probes Eugene, Oregon USA, C-195
- HPTSA= 8-Acetoxypyrene-1,3,6-trisulfonic acid, [HPTS-acetate], Molecular Probes Europe BV, A-396



CFDA



HPTSA

Der Xylemtransportweg wurde mit dem Xylemmarker Texas red<sup>®</sup> Dextran 3000 (Molecular Probes Eugene, Oregon USA, D-3328) markiert.

Von allen Farbstoffen wurden Stammlösungen hergestellt, die bei -20°C bis zu 7 Tagen gelagert werden können. Sie wurden für die Applikation unverdünnt bzw. mit Wasser verdünnt:

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

## 2.3.2 Applikation der Fluoreszenzfarbstoffe

### 2.3.2.1 CFDA und HPTSA

Eine Translokation im Phloem setzt eine erfolgreiche Aufnahme der applizierten Farbstoffe voraus. Um diese zu gewährleisten, wurde die obere Epidermis der Blätter ganzflächig mit feinem Sandpapier aufgeraut. Nach Auftropfen von 0,5 ml Farbstofflösung wurden die Blätter mit Haushaltsfolie abgedeckt, um den Turgor zu erhalten sowie ein Eintrocknen und Herabtropfen der Farbstofflösung zu vermeiden. Die Auswertung erfolgte nach 2,5-3 Stunden mittels konfokaler *laser scanning* Mikroskopie (CLSM).

### 2.3.2.2 Texas red<sup>a</sup> Dextran 3000

Die Markierung des Xylems erfolgte durch Einstellen der Versuchspflanzen in eine Texas red<sup>®</sup> Dextran 3000 Lösung für 30-60 Minuten.

Sollte eine Doppelmarkierung von Phloem und Xylem erfolgen, wurden 1,5-2 Stunden nach Applikation des phloemmobilen Farbstoffs die parasitierten Sprossachsen unterhalb der Parasitierung abgetrennt und für 30-60 Minuten mit der Schnittfläche in eine Texas red<sup>®</sup> Lösung überführt. Die Auswertung erfolgte ebenfalls durch konfokale *laser scanning* Mikroskopie.

## 2.3.3 Translokation von GFP

Transgene Pflanzen von *Nicotiana tabacum* und *Arabidopsis thaliana* (siehe Tab. 2-1), die das grünfluoreszierende Protein (GFP) der Meeresqualle *Aequorea victoria* unter dem AtSUC2-Promotor exprimieren, wurden als Wirtspflanzen für die Untersuchung des Proteintransfers verwendet.

Die Anzucht der Pflanzen erfolgte wie unter 2.1.2 beschrieben. *Nicotiana* wurde an der Sprossachse bzw. am Blattstiel, *Arabidopsis* an der Blütenstandsachse mit *C. reflexa*, *Arabidopsis* auch mit *C. odorata* und *C. platyloba*, parasitiert. Nach 14-18 Tagen wurden Handschnitte von den parasitierten Pflanzenorganen für die Auswertung mittels konfokaler *laser scanning* Mikroskopie angefertigt.

## 2.3.4 Konfokale *laser scanning* Mikroskopie (CLSM)

Für die Auswertung der Translokationsversuche mit Fluoreszenzfarbstoffen (CF, HPTS, Texas red<sup>®</sup>) und GFP am konfokalen *laser scanning* Mikroskop wurden Handschnitte mit einer Rasierklinge angefertigt und anschließend auf einem Objektträger in Silikonöl eingebettet. Dabei kommt es zum Austritt von Fluoreszenzfarbstoff aus den Schnittstellen.

Um eine Wiederaufnahme in umliegendes Gewebe zu vermeiden, erfolgte die Auswertung stets innerhalb von 10-20 min mit einem Zeiss Axiovert 100M (Carl Zeiss, Jena, Deutschland) kombiniert mit dem konfokalen *laser scanning* System-Zeiss LSM510.

Das Anregungslicht mit einer Wellenlänge von 488 nm wurde von einem Krypton/Argon Laser erzeugt. Ein 505-530 nm Emissionsfilter erlaubte die Detektion der GFP-, CF- bzw. HPTS-Fluoreszenz. Texas red<sup>®</sup> wurde durch grünes Licht der Wellenlänge 543 nm angeregt und die dadurch erzeugte Fluoreszenz mittels Emissionsfilter 560-615 nm detektiert.

### 2.3.5 Licht- und Elektronenmikroskopie

Aus erfolgreich parasitierten Sprossachsen von *Vicia* bzw. *Nicotiana* sowie Blütenstandsachsen von *Arabidopsis* wurden die Achsenabschnitte mit der Haustorialregion präpariert und zunächst in 3 %igem (v/v) Glutaraldehyd in Phosphatpuffer (pH 7,4) für 2 h vorfixiert. Die Fixierung erfolgte in 1 %igem (w/v) Osmiumtetroxid (OsO<sub>4</sub>) in Paladepuffer. Das Material wurde in einer Acetonreihe entwässert und schließlich in Spurr's Epoxydharz ERL (Epoxy Resin Low Viscosity) eingebettet (SPURR 1969). Nach erfolgter Infiltration wurden die Proben in Einbettungsgefäße überführt und zwei Tage bei 60°C polymerisiert. Die gesamte Prozedur wurde in einem Einbettungsautomaten (Lynx<sup>TM</sup> el, Reichert Leica, Deutschland) nach folgendem Schema durchgeführt:

Waschen mit Phosphat-Puffer	15 min
Waschen mit Phosphat-Puffer	30 min
Waschen mit Phosphat-Puffer	60 min
Waschen mit Phosphat-Puffer	60 min
1 % OsO <sub>4</sub> /Palade-Puffer	60 min
Waschen mit Leitungswasser	20 min
Aceton 20 %/Uranylacetat (2 %)	30 min
Aceton 30 %	10 min
Aceton 50 %	10 min
Aceton 75 %	10 min
Aceton 90 %	10 min
Aceton 100 %	20 min
Aceton 100 %	20 min
Aceton/ERL (1:1)	20 min
Aceton/ERL (1:2)	20 min
ERL 100 %	60 min
ERL 100 %	12 h

#### Zusammensetzung:

#### **Epoxydharz (ERL):**

ERL-4206	10 g
DER-736 (Weichmacher)	6 g
NSA (Härter)	26 g
S1 (Initiator)	0,4 g

#### **Paladepuffer:**

Veronal-Na	14,7 g
Natriumacetat x 3H <sub>2</sub> O	<u>9,7 g</u>
	ad 500 ml

### 2.3.5.1 Ultramikrotom

Für die Anfertigung der Semidünn- (1-2  $\mu\text{m}$ ) bzw. Ultradünnschnitte (50-70 nm) wurde ein Ultramikrotom (Ultracut S, Reichert Leica, Deutschland) mit einem Diamantmesser von Diatom (Schweiz) verwendet. Die erhaltenen Ultradünnschnitte wurden mit Chloroform gestreckt und mit Cedukol-beschichteten Kupferträgernetzchen (200 *mesh*) aufgenommen.

### 2.3.5.2 Kontrastierung der Präparate

Die Semidünnschnitte wurden zur Kontrastierung mit Azur II/Methylenblau (1 % Azur II in aqua dest./ 1 % Methylenblau in 1 % Borax = 1:1), die Ultradünnschnitte nach REYNOLDS (1963) mit Bleicitrat (1,5 g Bleiacetat und 1,76 g Natriumcitrat in 30 ml H<sub>2</sub>O für 30 min schütteln, danach Zugabe von 8 ml NaOH) gefärbt. Die Kontrastierung der Proben mit Blei erfolgte in einer CO<sub>2</sub>-freien Umgebung, da bleihaltige Kontrastmittel leicht mit dem Kohlendioxid der Luft Präzipitate ausbilden können. Aus diesem Grund wurden die Trägernetzchen in einer geschlossenen Kammer mit KOH-Plätzchen jeweils auf einen Tropfen Bleicitratlösung gelegt, nach 40 Minuten mit aqua dest. gewaschen und an der Luft getrocknet.

### 2.3.5.3 Auswertung der Präparate

Für die Auswertung und Dokumentation der kontrastierten Semidünnschnitte wurde ein Zeiss Axioskop 2 (Carl Zeiss, Jena, Deutschland) kombiniert mit einer SPOT<sup>TM</sup>-Kamera (Diagnostic instruments inc.) bzw. ein konfokales *laser scanning* Mikroskop verwendet. Bei der Untersuchung der Ultradünnschnitte kam ein Transmissionselektronenmikroskop (EM 912 OMEGA, LEO Elektronenmikroskopie, Oberkochen, Deutschland) zum Einsatz.

## 2.4 Translokation von Pflanzenviren

### 2.4.1 Inokulation von parasitierten Tabakpflanzen mit dem Kartoffelvirus Y (PVY<sup>N</sup>)

Der zu den Potyviridae, der größten Familie der Pflanzenviren gehörende Potyvirus PVY<sup>N</sup> (Kartoffelvirus Y, N-Stamm; [Isolat der Bundesanstalt für Züchtungsforschung und Kulturpflanzen, Aschersleben]) wurde aus dem Saft virusinfizierter Blätter gewonnen.

Aus systemisch infizierten Blättern von *Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN (SNN) wurden im Gewächshaus Scheiben ( $\varnothing$  9 mm) aus deutlich infizierten Blättern ausgestochen und mit 20 ml Natriumphosphatpuffer (5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,2) pro Gramm Blattmaterial im Mörser homogenisiert. Die so erhaltene frische Infektionslösung wurde für die Infektion von Tabakpflanzen benutzt, die 7 bzw. 14 d mit *C. reflexa* parasitiert waren.

Der Virusextrakt wurde auf mit Carborundumpuder (SiC, Sigma) bestäubte untere *source*-Blätter mit Hilfe eines Pistills auf der gesamten Blattoberfläche gleichmäßig verteilt. Dabei bot es sich an, 4-5 Pflanzen sukzessive zu markieren, zu bestäuben und zu infizieren. Nach kurzer Einwirkzeit wurden die Blattspreiten mit Wasser gut abgespült. Systemische Symptome waren etwa 5-7 Tage nach der Inokulation zu beobachten.

Mit Achsen der bereits 14 Tage parasitierenden *Cuscuta* wurde am Tage der Inokulation der Wirtspflanze eine zweite (gesunde) Tabak-Pflanze parasitiert (Brückeninfektion).

Achsen, die die erste Wirtspflanze zum Zeitpunkt der Infektion mit PVY<sup>N</sup> erst 7 Tage parasitierten, wurden eine Woche später auf eine zweite (gesunde) Tabak-Pflanze übergeleitet. Die Ernte der Systeme erfolgte 11 bzw. 18 Tage nach der Brückeninfektion.

<i>N. tabacum</i> cv. Samsun NN (SNN)	Aussaat	Parasitierung mit <i>Cuscuta reflexa</i>	PVY <sup>N</sup> Infektion	Brückeninfektion	Ernte
1. Pflanze	10.06.2002	18.07.2002	01.08.2002		
2. Pflanze	24.06.2002			01.08.2002	
					19.08.2002
1. Pflanze	17.06.2002	25.07.2002	01.08.2002		
2. Pflanze	01.07.2002			08.08.2002	

#### 2.4.2 Bestimmung des Titers an PVY<sup>N</sup>-Protein durch ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*)

Der Test wurde als Doppelter Antikörper Sandwich Test (DAS) durchgeführt. Hierfür werden die ELISA-Platten zuerst mit einem spezifischen Antikörper beschichtet, das Testmaterial zugesetzt, und noch einmal mit einem (konjugierten) spezifischen Antikörper überschichtet. Der ELISA wurde unter Verwendung folgender Lösungen durchgeführt:

<u>coating-Puffer:</u>	1,95 g Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	<u>PBS-Puffer (10x):</u>	80 g NaCl
	2,93 g NaHCO <sub>3</sub>		2,4 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	0,2 g NaN <sub>3</sub>		14,4 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 12H <sub>2</sub> O
	ad 1 l pH 9,6		2 g KCl
			ad 1 l pH 7,4 mit NaOH (Lösung autoklavieren)
<u>Extraktionspuffer :</u>	1x PBS-Puffer	<u>Waschpuffer:</u>	1x PBS-Puffer
	0,05 % Tween 20		0,05 % Tween 20
	2 % PVP 25000 (lösliches PVP)		
	0,2 % BSA		
<u>Substrat-Puffer:</u>	800 ml H <sub>2</sub> O		
	203 mg MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O		
	97 ml Diethanolamin		
	0,2 g NaN <sub>3</sub>		
	ad 1 l pH 9,6 mit HCl		
	(Lösung kühl und dunkel lagern)		

Substrat: 1 mg/ml 4-Nitrophenyl-Phosphat (Roth) in Substratpuffer (frisch)

Antikörper: anti PVY IgG (BIOREBA, Reinach, Schweiz)  
anti PVY IgG conjugated (BIOREBA, Reinach, Schweiz)

Zunächst wurden die Mikrotiterplatten (PS Mikroplatte, 96 well, Flachboden, Greiner) mit dem ersten Antikörper überzogen. Zu diesem Zweck wurde der Antikörper (anti PVY IgG, BIOREBA) in *coating*-Puffer verdünnt (1:1000) und dann jeweils 100 µl dieser Lösung in eine Plattenöffnung pipettiert. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C. Anschließend wurden die Platten mit Waschpuffer mehrmals gewaschen. Die mit Antikörper beschichteten Platten können bis zu 6 Monaten bei -20°C gelagert werden.

Zur Ausführung des Testes wurden jeweils 100 µl der folgenden Lösungen in die einzelnen Vertiefungen pipettiert: Positivkontrolle, unverdünnte Probe sowie eine serielle Verdünnung der Probe (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128). Grundsätzlich wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Inkubation erfolgte für 12 h bei 4°C. Anschließend wurden die Platten wie oben beschrieben gewaschen. Nach Auftragen des 1:1000 in Extraktionspuffer verdünnten PVY-Konjugat (100 µl/well, anti PVY IgG conjugated, BIOREBA ) wurden die Platten bei 30°C für 4 Stunden inkubiert.

Nach fünfmaligem Waschen wurden 100 µl Substrat (p-Nitrophenyl-Phosphat, 1 mg/ml Substratpuffer) in alle Öffnungen gegeben und der Testansatz im Dunkeln bis zum Sichtbarwerden einer Gelbfärbung bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde mit 50 µl 3 M NaOH/Öffnung abgestoppt.

Die Quantifizierung des Virustiters erfolgte durch Messung der OD<sub>405nm</sub> mit einem ELISA-Lesegerät 340 ATTC (SLT, Crailsheim).

Alle Inkubationen erfolgen in einer feuchten Kammer.

Die Herstellung der verwendeten Pflanzenextrakte erfolgte durch Mörsern von Pflanzenmaterial mit Extraktionspuffer. Unlösliches Pflanzenmaterial wurde durch Zentrifugieren (13000 rpm, 5 min, 4°C) sedimentiert. Als Positivkontrolle wurde sichtbar PVY<sup>N</sup>-infiziertes Pflanzenmaterial (Scheiben aus den Interkostalfeldern von Tabakblättern) aufgearbeitet und vermessen.

## 2.5 RNA-Methoden

### 2.5.1 RNA-Isolierung aus dem Wirt-Parasit-System *N. tabacum* cv. SNN-C. *reflexa*

Nach erfolgreicher „Brücken-Infektion“ des Wirt-Parasit-Systems *Nicotiana tabacum* cv. SNN-*Cuscuta reflexa* wurden *sink*-Blätter beider Wirtspflanzen, die parasitierten Pflanzenabschnitte und der Parasit geerntet und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Isolierung der RNA erfolgte nach der geringfügig modifizierten Methode von LOGEMANN ET

AL. 1987. Dazu wurde Pflanzenmaterial mit flüssigem Stickstoff zu feinem Pulver gemörser. Vor dem Auftauen wurde Z6-Puffer [8 M Guanidinhydrochlorid, 20 mM MES, 20 mM EDTA, 0,7 % (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol, pH 7 mit NaOH, optional 1 % PVPP] im Verhältnis 1:3 (w/v) dazugegeben und die Probe bis zur vollständigen Homogenität bearbeitet.

Der Extrakt wurde mit 0,5 Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) zum Entfernen von Proteinen ausgeschüttelt und anschließend zentrifugiert (4°C, 13000 rpm, 10 min). Die wässrige Phase wurde mit 1/20 Volumen 1 M Essigsäure und 0,7 Volumen absolutem Ethanol versetzt, gut durchmischt und die RNA bei -20°C gefällt. Nach Zentrifugation (4°C, 13000 rpm, 20 min) wurde das Pellet 2x mit 3 M Natriumacetat (pH 5,2) gewaschen und jeweils 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Nach weiteren Waschschrritten mit 70 %igem Ethanol wurde das RNA-Pellet zentrifugiert. Nach dem Trocknen bei 65°C wurde das Pellet in DEPC-H<sub>2</sub>O vollständig resuspendiert. Die Proben wurden bei -70°C für mindestens 2 Stunden eingefroren, nachfolgend bei 65°C aufgetaut und die RNA-Konzentration bei 260 nm am Photometer bestimmt.

Um den Kontaminationsgrad durch Proteine zu prüfen, wurde eine zusätzliche Extinktionsbestimmung bei 280 nm vorgenommen.

Alle zur RNA-Isolierung verwendeten Lösungen wurden mit DEPC-Wasser angesetzt. Dazu wurden 10 ml 10 % (w/v) Diethylpyrocarbonat (in Ethanol) mit bidestilliertem H<sub>2</sub>O auf einen Liter aufgefüllt, mehrfach geschüttelt und über Nacht stehen gelassen. Schließlich wurde der Ansatz zweimal autoklaviert.

### 2.5.2 Gelelektrophoretische Auftrennung von RNA

Zur Auftrennung von RNA wurden 1,5 %ige Gele verwendet. Dazu wurden 3 g Agarose in 150 ml Wasser in der Mikrowelle gelöst, auf 60°C abgekühlt und 20 ml 10x MEN (0,2 M MOPS, 10 mM EDTA, 50 mM Natriumacetat, pH 7) sowie 30 ml Formaldehyd vor dem Gießen hinzugegeben.

Die stark denaturierende Wirkung von Formaldehyd unterbindet RNase-Aktivität während der Gelelektrophorese und verhindert die Ausbildung von Sekundärstrukturen der RNA. Dadurch ist die Laufgeschwindigkeit der RNA ihrem Molekulargewicht annähernd proportional (LEHRACH ET AL. 1977).

Die RNA-Proben wurden vor dem Auftragen auf das Gel in folgendem Ansatz denaturiert:

24  $\mu$ l RNA (20  $\mu$ g/H<sub>2</sub>O), 6  $\mu$ l 10x MEN, 24  $\mu$ l Formamid, 6  $\mu$ l Formaldehyd.

Der Ansatz wurde für 10 Minuten bei 65°C erhitzt, mit 5  $\mu$ l Probenpuffer und 1  $\mu$ l Ethidiumbromid versetzt und die Probe auf das Gel aufgetragen. Die Gelelektrophorese erfolgte auf horizontalen Gelen in 1x MEN als Laufpuffer bei einer angelegten Spannung von 120 V.

### 2.5.3 Kapillartransfer von RNA auf Nylonmembranen (Northern Blot)

Das Agarosegel wurde auf eine vorbereitete Filterbrücke aus einer Lage von angefeuchtem Whatman 3MM-Filterpapier gelegt. Die Brücke tauchte mit ihren Enden in eine Schale mit 20x SSC (1,5 M NaCl, 150 mM Natriumcitrat). Auf das Gel wurde eine passend zugeschnittene GENESCREEN<sup>®</sup>-Membran (NEN, Boston, USA) blasenfrei gelegt, darüber weitere zwei Lagen 3MM-Filterpapier sowie mehrere Lagen saugfähiges Papier (ca. 5 cm Höhe) geschichtet. Der ganze Transferaufbau wurde schließlich mit einem Gewicht beschwert und für mindestens 20 Stunden geblottet. Nach dem Blotabbau wurde die Nylon-Membran für 2 Stunden bei 80°C inkubiert, wodurch die RNA kovalent an die Membran gebunden wurde.

### 2.5.4 Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten

Zur radioaktiven Markierung von DNA-Fragmenten wurden 30-100 ng DNA mit sterilem H<sub>2</sub>O auf das Volumen von 13 µl aufgefüllt und für 5-10 Minuten bei 95°C denaturiert. Anschließend wurden 4 µl „*high prime*“-Kit (Roche, Mannheim) und 30 µCi [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dCTP (Amersham) zugegeben. Der „Reaktionsmix“ enthielt optimale Konzentrationen an Nukleotiden, Zufallsprimern und dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase. Der Ansatz wurde für 10 Minuten bei 37°C inkubiert und danach die nicht eingebauten dCTPs von der nunmehr radioaktiv markierten DNA durch Gelfiltration über eine Sephadex G50-Säule abgetrennt. Die Aktivität der radioaktiven Probe sollte über 300 dpm/µg eingesetzter DNA betragen. Schließlich wurde das markierte DNA-Fragment durch eine dreiminütige Inkubation bei 95°C in Einzelstränge aufgetrennt und zu dem Hybridisierungsansatz pipettiert (s. 2.5.5).

### 2.5.5 Hybridisierung der RNA-tragenden Nylonmembran

Die RNA-tragende Nylonmembran wurde mindestens 2 Stunden in Church-Puffer (CHURCH & GILBERT 1984, [50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Puffer (pH 7,2), 2 mM EDTA, 7 % (w/v) SDS, 1 % (w/v) BSA]) bei 65°C in einer Fotoschale prähybridisiert, um die unspezifischen Bindungsstellen für die DNA-Sonde abzusättigen. Die denaturierte, radioaktive DNA-Probe (s. 2.5.4) wurde zum Hybridisierungsansatz zugegeben und über Nacht (16-24 h) mit der Membran bei 65°C inkubiert. Nach der Hybridisierung wurde die Membran für 20 min bei 65°C in 6x SSC (225 mM NaCl, 22,5 mM Natriumcitrat) mit 0,1 % SDS gewaschen. Es folgten weitere Waschstreps (1x mit 4x SSC, 1x mit 2x SSC) bis in der Waschlösung keine Radioaktivität mehr detektierbar war. Die Membran wurde in Plastikfolie eingeschweißt und an einem Röntgenfilm (X-OMAT, Kodak) in einer lichtundurchlässigen Kassette für 4-72 h bei -70°C exponiert.

## 2.6 Nachweis von GFP über Western-Blot

Das Brückensystem *GFP-Arabidopsis-Cuscuta-WT-Arabidopsis* wurde in definierte Abschnitte geteilt, wobei darauf geachtet wurde, dass bei der Aufarbeitung der zweiten Wirtspflanze (*WT-Arabidopsis*) keine Verunreinigung mit Material der ersten Wirtspflanze eintrat. Die einzelnen Abschnitte wurden in flüssigem Stickstoff in Anwesenheit von 2x Probenpuffer (LAEMMLI 1970) und *protease-inhibitor-cocktail* homogenisiert. Das gefrorene Pulver wurde aufgetaut, 5 min bei 95°C solubilisiert und anschließend zur Sedimentation des unlöslichen Materials 5 min bei 13000xg zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C gelagert.

Gleiche Mengen des Überstandes wurden elektrophoretisch nach der Vorschrift von LAEMMLI (1970) aufgetrennt. Die Trennung der Proteine erfolgte in 16 %igen Gelen. Die Sammelgele enthielten 5 % Acrylamid. Als Elektrophoresepuffer wurde ein einfach-konzentrierter SDS-PAGE Laufpuffer (E-Laufpuffer) nach LAEMMLI benutzt. Die einzelnen Lösungen hatten folgende Zusammensetzungen:

### 30 % Acrylamid Mix (pH 7,0):

29 % (w/v) Acrylamid  
1 % (w/v) Bisacrylamid

### 10 x E-Laufpuffer:

0,25 M Tris  
1,92 M Glycin  
1 % (w/v) SDS

### 16 % Trenngel:

H <sub>2</sub> O	6,50	ml
30 % (w/v) Acrylamid Mix	13,30	ml
2 M Tris (pH 8,8)	4,70	ml
10 % (w/v) SDS	0,25	ml
10 % (w/v) APS	0,25	ml
TEMED	0,01	ml

### 5 % Sammelgel:

H <sub>2</sub> O	3,40	ml
30 % (w/v) Acrylamid Mix	0,83	ml
1 M Tris (pH 6,8)	0,63	ml
10 % (w/v) SDS	0,05	ml
10 % (w/v) APS	0,05	ml
TEMED	0,005	ml

An die Auftrennung der Proteinbanden durch die SDS-PAGE schloss sich ein Western-Blot für den selektiven Nachweis des grünfluoreszierenden Proteins an.

Der Proteintransfer erfolgte bei 6°C und einer Stromstärke von 1 mA/cm<sup>2</sup> Nitrocellulose für 60 min. Vor der Antikörperbehandlung erfolgte eine über Nacht durchgeführte Inkubation des Blots in Blocklösung, um die gesamte Membran mit Proteinen zu beladen. Die Inkubation mit dem 1. Antikörper erfolgte in der Blocklösung für 1,5 h bei RT. Nach drei fünfminütigen Waschschritten mit Waschpuffer unter starkem Schwenken wurde der Blot 60 min bei RT unter Schütteln mit einem 2. Antikörper in der Blocklösung inkubiert. Unspezifisch gebundener Antikörper wurde wiederum durch drei fünfminütige Waschschrritte unter Schütteln mit Waschpuffer abgewaschen. Die Membran wurde in Plastikfolie eingeschweißt und nach Zugabe und 3-minütiger Inkubation mit dem Substrat an einem Film (Hyperfilm ECL, Amersham) in einer lichtundurchlässigen Kassette exponiert.

Die einzelnen Versuchsmedien hatten folgende Zusammensetzung:

<u>Transferpuffer:</u>	25 mM Tris 150 mM Glycin <u>10 % (v/v) Methanol</u> ad 200 ml H <sub>2</sub> O
<u>10x PBS-Puffer:</u>	91,6 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O 23,5 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O <u>40,0 g NaCl</u> ad 1000 ml
<u>Waschpuffer:</u>	1x PBS + 0,1 % (v/v) Tween 20
<u>Blocklösung:</u>	1x PBS + 0,1 % (v/v) Tween 20 + 1 % (w/v) Blotting Grade Blocker, Not-Fat Dry Milk (BioRAD Laboratories)
<u>Antikörper:</u>	1. AK polyclonaler GFP-Antikörper (ab290; www.abcam.com) 2. AK goat anti rabbit HRP ( <b>H</b> orseradish <b>P</b> eroxidase)
<u>Substrat:</u>	Stable Peroxid Buffer : Luminol/Enhancer Solution (1:1) (beide Lösungen von Super Signal West Dura)

## 2.7 Translokation des Alkaloids Nicotin

*Nicotiana tabacum* cv. SNN wurde im natürlichen Windungsmodus am Stengel und an Blattstielen mit Sprossen von *Cuscuta reflexa* parasitiert. Nach 8 Wochen Parasitierung wurden Tabakblätter und *Cuscuta*-Achsen abgeschnitten und bei 100°C im Trockenschrank getrocknet. Anschließend wurde das Pflanzenmaterial homogenisiert und über Nacht bei Raumtemperatur mit der vierfachen Menge 0,1 N HCl unter Schütteln extrahiert. Der Extrakt wurde mit NaOH auf pH 10 eingestellt und mehrmals mit Dichlormethan für 3-5 Minuten ausgeschüttelt. Die Dichlormethan-Phase wurde eingedampft und der Rückstand in 150 µl erneut aufgenommen.

Der Extrakt wurde mittels Gaschromatographie (GC) fraktioniert. Im Anschluss erfolgte die Identifizierung von Nicotin durch Elektrospray-Massenspektroskopie (ESI-MS). Fraktionierung und Identifizierung wurden in der Abteilung Naturstoffchemie des Institutes für Pflanzenbiochemie durchgeführt.

## 2.8 Translokation von Schwermetall

*Vicia faba*-Pflanzen wurden wie unter 2.1.2 beschrieben angezogen und nach Erreichen des Vier-Blatt Stadiums mit *Cuscuta reflexa*-Achsen parallel parasitiert. Nach erfolgreicher Ausbildung von Haustorien wurden die Wurzeln der *Vicia*-Pflanzen freigespült und in eine 1

mM Cadmium-Chlorid-Lösung überführt. Nach einer Versuchsdauer von 6 Tagen wurden die Systeme in definierte Abschnitte geteilt, mit flüssigem Stickstoff gemörsert und das so erhaltene Pflanzenpulver gefriergetrocknet.

Zur Bestimmung von Cadmium wurden maximal 100 mg Pflanzenpulver eingewogen, mit 6 ml konz.  $\text{HNO}_3$  sowie 4 ml  $\text{H}_2\text{O}$  versetzt und in PFA-Aufschlussbehältern in der Mikrowelle (MDS-205, CEM) in einem zweistufigen Prozess vollständig in Lösung gebracht. Diese wurde ad 25 ml mit aqua dest. aufgefüllt und durch Atom-Absorptions-Spektroskopie (AAS-Analyst 800, Perkin Elmer, Überlingen) analysiert. Die Flamme war ein Acetylen-Luft-Gemisch. Der Bestimmung des Gehalts von Cadmium lag eine Eichreihe zu Grunde.

## 2.9 Quantitative Kohlenhydratbestimmungen

Für die quantitative Bestimmung von Glucose, Fructose, Saccharose und Stärke wurden die Achsen stets in ihrer gesamten, am Versuchstag vorliegenden Länge eingesetzt und nach folgendem Schema zerschnitten:

Abschnitt 1 →	1 cm	0-1cm hinter der Spitze
Abschnitt x →	X cm	Neuzuwachs
Abschnitt 2 →	5 cm	20 cm vom basalen Ende
Abschnitt 3 →	5 cm	
Abschnitt 4 →	5 cm	
Abschnitt 5 →	5 cm	basales Ende

Zu Beginn des Versuches war die Achse 21 cm lang und bestand aus fünf Abschnitten. Der zum Zeitpunkt der Aufarbeitung vorhandene Neuzuwachs wurde unter Abschnitt X zusammengefasst.

Die Abschnitte wurden unter flüssigem Stickstoff staubfein zerrieben und in 80 %igem Ethanol für 1 h bei 80°C im Wasserbad extrahiert.

Durch Zentrifugieren bei 6000 rpm für 10 Minuten, Waschen des Rückstandes mit 80 %igem Ethanol und nochmaligem Zentrifugieren wurde der Überstand mit den löslichen Zuckern vom Pellet, das die Stärke enthält, getrennt.

Nach einmaligem Waschen mit aqua dest. (1 ml/100 mg FM), anschließender Zentrifugation und Abnehmen des Überstandes wurde das Pellet unter Zugabe von aqua dest. (1 ml/100 mg FM) zur Gelatinisierung der Stärke für 1 Stunde bei 100°C im Wasserbad erhitzt. Nach Abkühlung wurde in Essigsäure-Natriumacetat-Puffer (50 mM, pH 4,5) gelöste Amyloglucosidase (1 ml/100 mg FM, 20 U/ml, Merck, Darmstadt) zugegeben und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Die quantitative Spaltung der Stärke wurde durch Tüpfeln mit Jod-Jodkalium überprüft.

Die Bestimmung von Glucose, Fructose und Saccharose erfolgte mit der Testkombination 716260 von Roche Diagnostic. Mit ihr ist es möglich, aus einer Probe alle drei Zucker zu

bestimmen, wobei Glucose direkt, Saccharose und Fructose indirekt, nach enzymatischer Umsetzung zu Glucose, bestimmt werden.

Als Messgröße dient in allen Fällen die bei der Reaktion von Glucose-6-Phosphat mit  $\text{NADP}^+$  gebildete NADPH-Menge, die bei 340 nm im Spektrophotometer (Uvikon 931, KONTRON-Instruments) bestimmt wurde. Aus ökonomischen Gründen wurden die in der Gebrauchsanweisung angegebenen Mengen für die Bestimmung halbiert.

Bestimmungen und Umsetzungen der einzelnen Kohlenhydrate verliefen wie folgt:

- D-Glucose wird durch Hexokinase und ATP zu D-Glucose-6-phosphat umgesetzt, das durch  $\text{NADP}^+$  unter Mitwirkung von Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase zu D-Gluconat-6-phosphat oxidiert wird. Dabei entsteht eine stöchiometrische Menge NADPH, die im Spektrophotometer (Uvikon 931, KONTRON-Instruments) bei 340 nm bestimmt wurde.
- D-Fructose wird nach Phosphorylierung zu D-Fructose-6-phosphat durch Phosphoglucose-Isomerase zu Glucose-6-phosphat umgesetzt, das wie bei der Glucosebestimmung durch  $\text{NADP}^+$  zu D-Gluconat-6-phosphat unter Bildung von NADPH oxidiert wird.
- Saccharose wird zunächst durch Invertase ( $\beta$ -Fructosidase) bei pH 4,6 zu D-Glucose und D-Fructose gespalten. Anschließend wird der Glucosegehalt der Probe nach dem oben beschriebenen Prinzip bestimmt. Der erhaltene Wert repräsentiert die in der Probe vorliegende Gesamtmenge an Glucose. Durch Subtraktion der vor der Spaltung der Saccharose bestimmten Glucosemenge erhält man die in der Probe enthaltene Menge an Saccharose.

Die Stärkebestimmung erfolgte ebenfalls enzymatisch über die Bestimmung der bei der Spaltung mit Amyloglucosidase erhaltenen Glucose. Dazu wurde die Testkombination 716251 von Roche Diagnostic benutzt. Die Menge der Stärke wird in Glucose angegeben.

Aus den erhaltenen Extinktionswerten wurden Konzentrationsangaben berechnet und unter Berücksichtigung der Verdünnungsfaktoren und der eingesetzten Trockenmassen auf den Gehalt bzw. die Konzentration der einzelnen Kohlenhydrate in den Abschnitten umgerechnet.

Die Berechnung der Konzentration erfolgte nach der allgemeinen Formel:

$$c = \frac{V * MG}{\epsilon * v * d * 1000} * \Delta E \text{ [g/l]}$$

- V = Testvolumen [ml]  
 v = Probevolumen [ml]  
 MG = Molekulargewicht der zu bestimmenden Substanz [g/mol]  
 d = Schichtdicke [cm]  
 $\epsilon$  = Extinktionskoeffizient von NADPH bei 340 nm = 6,3 [l \* mmol<sup>-1</sup> \* cm<sup>-1</sup>]

## 2.10 Verwendete radioaktive Verbindungen

Verbindung	Spez. Radioaktivität	Lieferfirma
Saccharose-6,6'(n)- <sup>3</sup> H	258 GBq*mmol <sup>-1</sup>	Amersham
Saccharose-U- <sup>14</sup> C	25,0 GBq*mmol <sup>-1</sup>	Amersham
a-Aminoisobuttersäure-methyl- <sup>3</sup> H	555 GBq*mmol <sup>-1</sup>	ARC
a-Aminoisobuttersäure-1- <sup>14</sup> C	2,18 GBq*mmol <sup>-1</sup>	Amersham
MCPA-1- <sup>14</sup> C	2,1 GBq*mmol <sup>-1</sup>	Amersham
Glyphosat-U- <sup>14</sup> C	2,0 GBq*mmol <sup>-1</sup>	Amersham
Atrazin-ethyl-1- <sup>14</sup> C	925 MBq*mmol <sup>-1</sup>	Amersham
Diuron-methyl- <sup>14</sup> C	2,11 GBq*mmol <sup>-1</sup>	Amersham

## 2.11 Begriffsdefinitionen

Als „**Aufnahmerate**“ wird der prozentuale Anteil der in das Wirt-Parasit-System aufgenommenen radioaktiven Verbindungen an der Menge der angebotenen radioaktiven Verbindungen bezeichnet.

$$\text{Aufnahmerate (\%)} = \frac{\Sigma \text{ Radioaktivität im Wirt-Parasit-System (dpm)}}{\text{Radioaktivität in der Fütterungslösung (dpm)}} * 100$$

Als „**Translokationsrate**“ wird der prozentuale Anteil der aus dem Applikationsorgan austransportierten radioaktiven Verbindungen an der Gesamtmenge der in das Wirt-Parasit-System aufgenommenen radioaktiven Verbindungen bezeichnet.

$$\text{Translokationsrate (\%)} = \frac{\Sigma \text{ Radioaktivität außerhalb des Fütterungsorgans (dpm)}}{\Sigma \text{ Radioaktivität im Wirt-Parasit-System (dpm)}} * 100$$

Als „**Verteilungsmuster**“ wird der prozentuale Anteil der in den einzelnen Pflanzenabschnitten vorliegenden radioaktiven Verbindungen an der Gesamtmenge der im Wirt-Parasit-System transportierten Verbindungen bezeichnet.

$$\text{Verteilungsmuster (\%)} = \frac{\text{Radioaktivitätsgehalt des Pflanzenabschnittes (dpm)}}{\Sigma \text{ Radioaktivität außerhalb des Fütterungsorganes (dpm)}} * 100$$

## 2.12 Auswertung der Ergebnisse

Alle Versuche wurden zur Absicherung der Ergebnisse mehrmals wiederholt. Die Anzahl der Einzelwerte ist mit „n“ angegeben. Die angegebenen Ergebnisse stellen, wenn nicht anders vermerkt, Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte dar (mean  $\pm$  SE).

## 2.13 Darstellung der mikroskopischen Ergebnisse

Alle durch die konfokalen *laser scanning* Mikroskopie erhaltenen Aufnahmen wurden wie folgt dargestellt: **Fluoreszenzaufnahme–Transmissionsaufnahme–Bildkombination.**

### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 Transport aus dem Wirt in den Parasiten

##### 3.1.1 Etablierung des Wirt-Parasit-Systems *Vicia faba-Cuscuta reflexa*

Für die Parasitierung der *Vicia*-Pflanzen mit *Cuscuta reflexa* wurden zunächst Achsen von der Stammkultur *Pelargonium zonale* isoliert. Sie hatten eine definierte Länge von 21 cm und eine durchschnittliche Dicke von 4 mm.

Zur Ausbildung von Haustorien und damit zur Parasitierung von *Vicia faba* ist die Achse nicht in ihrer gesamten Länge, sondern nur mit ihrer „kontaktreizbaren Zone“, die dem Abschnitt zwischen 1 und 6 cm von der Spitze entspricht, in der Lage. Diese wurde durchgehend mit einem inerten Klebeband an einer Flanke des vierkantigen hohlen *Vicia*-Stengels befestigt und leicht angedrückt. Die Parasitierung erfolgte in allen Fällen im „parallelen Induktionsmodus“. Dabei wird das natürliche Linkswinden des Parasiten um den Wirt unterdrückt und eine Anordnung der sich untereinander bildenden Haustorien ausschließlich an einer Flanke des Stengels erzwungen. Die Wirtspflanzen befanden sich zum Zeitpunkt der Parasitierung im Vier- bis Sechsstadium, die Parasitierung erfolgte am zweiten bzw. dritten Internodium.

Zur Ausbildung eines funktionellen Kontaktes und der damit verbundenen Versorgung mit Assimilaten aus der Wirtspflanze ist in der Regel ein Zeitraum von ca. 8-12 d notwendig.

Eine Analyse des Wachstumsverlaufs (Abb. 3-1) zeigte in den ersten vier Tagen eine Zunahme der Gesamtlänge von durchschnittlich 5,9 cm. Der Zuwachs ist dabei nur auf den ersten, am Tag der Infektion freien 1 cm langen Abschnitt, beschränkt.

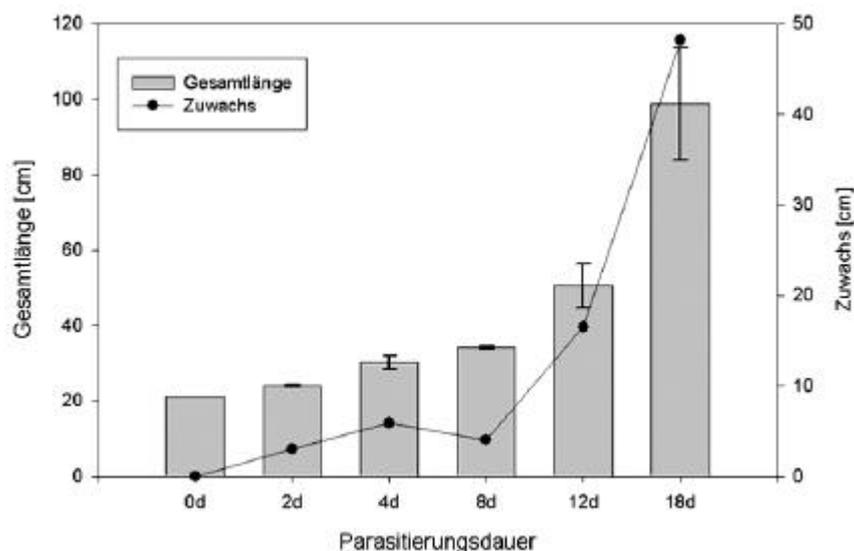


Abb. 3- 1: *Vicia faba-Cuscuta reflexa*

Wachstum der *Cuscuta*-Achsen während der Ausbildung des funktionellen Haustorienanschlusses

n=4, mean ± SE; Die der Abb. zugrunde liegenden Werte sind in Tab. A im Anhang zusammengefasst.

Nach 4 Tagen setzte eine Stagnation des Wachstums ein, die bis zum 8. Tag anhielt. Zum gleichen Zeitpunkt konnte im Bereich der kontaktreizbaren Zone die Anlage von Prähaustorien durch Gewebeverdickungen beobachtet werden. Ab dem achten Versuchstag war ein Anstieg der Wachstumsgeschwindigkeit (4,1 cm/d) und damit ein größerer Zuwachs der Gesamtlänge zu beobachten. Am 12. Tag besaßen die Achsen eine Gesamtlänge von 50,6 cm (=241 % der Ausgangslänge). Nach 18 d hatte sich mit  $98,7 \pm 14,9$  cm die Ausgangslänge der Achsen nahezu vervierfacht (Abb. 3-1). Das sind Anzeichen für eine vollständige Ausbildung von Haustorien mit funktionellen Kontakt.

Bis zur vollständigen Entwicklung der funktionellen Haustorien ist der Parasit auf die Substanzen angewiesen, die zum Zeitpunkt der Isolierung von der Stammkultur in der Achse vorliegen.

Wir bestimmten 2, 4, 8 und 12 Tage nach Beginn der Parasitierung in den *Cuscuta*-Achsen den Gehalt an Stärke, Saccharose, Glucose und Fructose. Zur Erfassung der Veränderungen im Kohlenhydratgehalt wurde der Gehalt von in gleicher Weise aufgearbeiteten Ausgangsachsen =100 % gesetzt und die Werte, die zu den angegebenen Zeitpunkten ermittelt wurden, darauf bezogen. Abb. 3-2 fasst die Ergebnisse zusammen. Nach 2 Tagen lagen nur noch 76,8 %, nach 4 Tagen nur noch 48,7 % des Ausgangsgehaltes an Kohlenhydraten in den parasitierenden Achsen vor.

Zwischen dem vierten und achten Tag, dem Zeitraum der Wachstumsstagnation, nahm der Gesamtgehalt an Kohlenhydraten weiter ab. Er lag am 8. Tag nur noch bei 39,9 % des Ausgangsgehaltes. Ab dem 8. Tag kommt es zur Ausbildung des funktionellen Kontaktes zwischen *Vicia* und *Cuscuta*. Das ist neben dem gesteigerten Zuwachs auch an der Zunahme des Kohlenhydratgehalts in den Achsen sichtbar. Am 12. Tag nach Beginn der Parasitierung erreicht er bereits 88,1 % des Ausgangswertes.

Auch das Ausscheiden von Saccharosetröpfchen, bevorzugt in den nicht wachsenden Achsenabschnitten, ist ein Anzeichen für den nun beginnenden luxurierenden Versorgungszustand der Achsen.

Bei gesonderter Betrachtung der löslichen Kohlenhydrate (Glucose, Fructose, Saccharose) und der Stärke war besonders in den ersten zwei Tagen nach Beginn der Infektion eine starke Abnahme an Stärke festzustellen. In den Achsen lagen am zweiten Tag nur noch 57,2 % des Ausgangswertes vor, der Wert verringerte sich auf 27,3 % am vierten bzw. 20,2 % am achten Tag. Der Gehalt an löslichen Kohlenhydraten blieb dagegen bis zum zweiten Tag mit 99,8 % des Ausgangswertes nahezu konstant. Ihre deutliche Abnahme erfolgte zwischen dem zweiten und vierten Tag. Am vierten Tag betrug der Gehalt an löslichen Kohlenhydraten noch 54,3 % des Ausgangswertes, er verringerte sich bis zum 8. Tag nur noch geringfügig auf 49,5 %. Am 12. Versuchstag wurde für alle Fraktionen ein Anstieg gegenüber dem 8. Tag gemessen. Die Stärke erreichte 49,9 %, die Fraktion der löslichen Kohlenhydrate 97,0 % der Ausgangswerte.

Bei den löslichen Kohlenhydraten sind die Veränderungen in erster Linie auf eine Abnahme der Monosaccharide zurückzuführen. Der starke Abbau der Stärke zwischen Beginn und dem zweiten Tag der Parasitierung hat zur Folge, dass vermehrt Saccharose als Transportzucker in der Achse auftritt. So konnte im gleichen Zeitraum ein Anstieg der Saccharose auf 188,7 % des Ausgangswertes in den Achsen ermittelt werden. Im weiteren Versuchsverlauf nimmt der Gehalt an Saccharose zwar wieder ab, sinkt aber mit 97,4 % am vierten und 98,3 % am achten Tag niemals deutlich unter den Ausgangswert. Am 12. Versuchstag wird mit 184,2 % des Ausgangswertes auch für Saccharose ein deutlicher Anstieg als Ausdruck des funktionellen Anschlusses an die Leitbündel der *Vicia* sichtbar (s. auch Tab. B im Anhang).

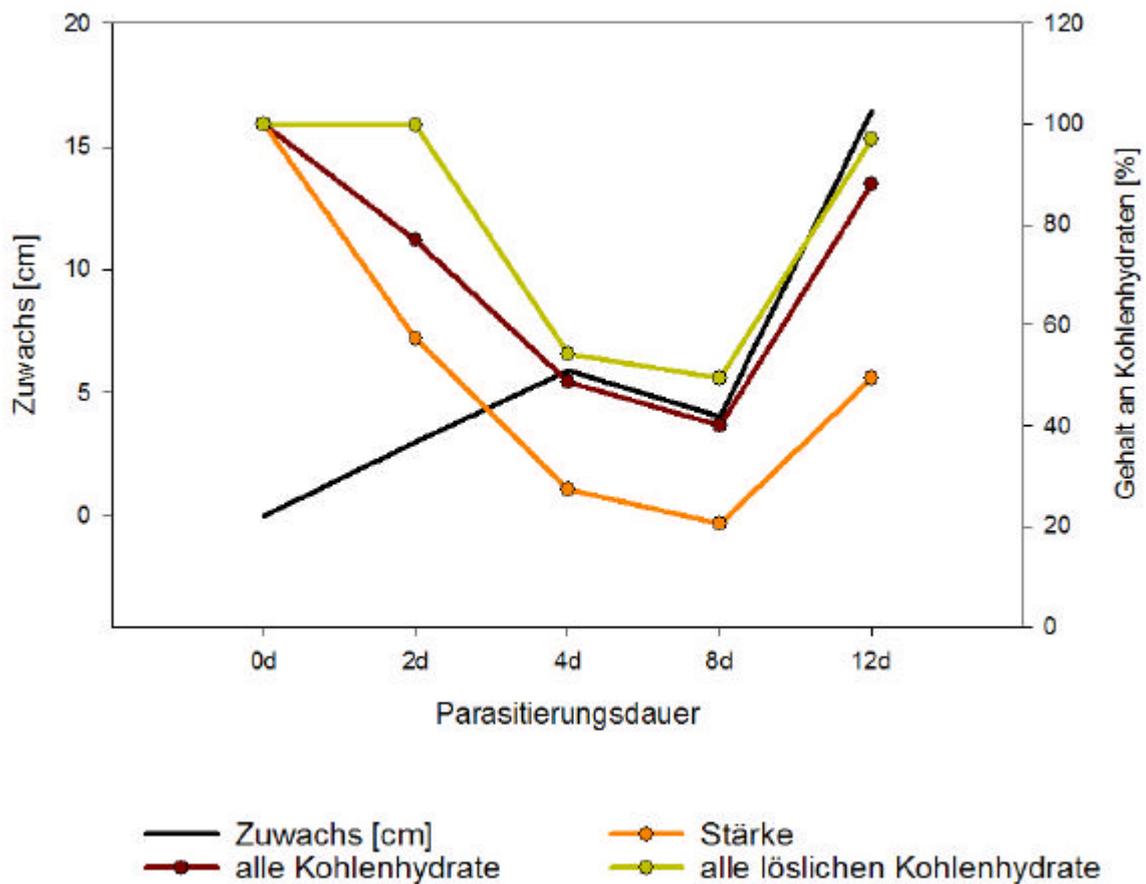


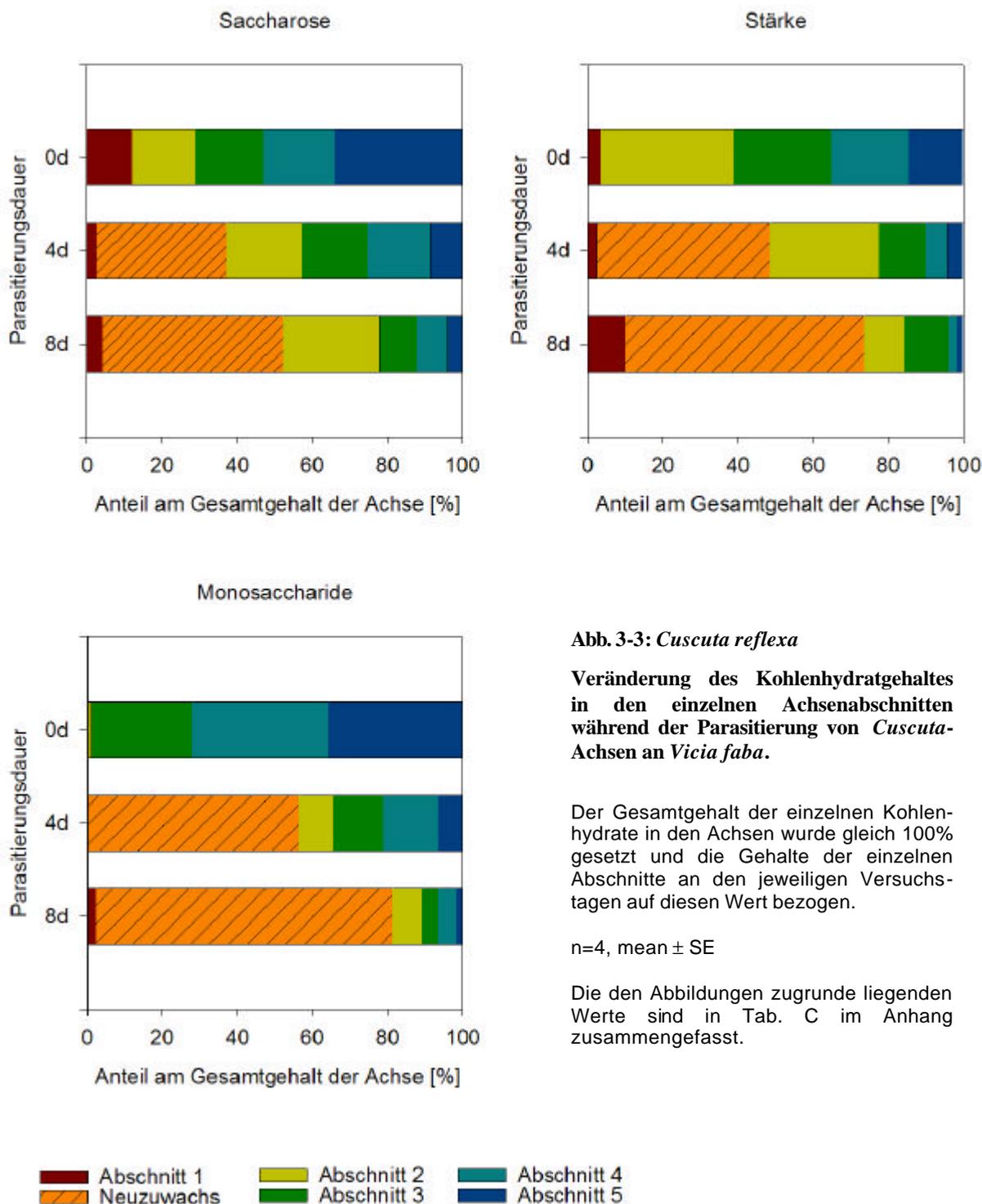
Abb. 3- 2: *Vicia faba-Cuscuta reflexa*

**Veränderungen des Kohlenhydratgehaltes in den *Cuscuta*-Achsen während der Ausbildung des funktionellen Haustorienanschlusses**

Die der Abb. zugrunde liegenden Werte sind in Tab. B im Anhang zusammengefasst.

Setzt man den Gesamtgehalt der einzelnen Kohlenhydrate in den Achsen gleich 100 % und berechnet den Anteil der einzelnen Achsen-Abschnitte (siehe 2.8) an ihm zum jeweiligen Versuchszeitpunkt (4 und 8 Tage nach Beginn der Parasitierung), so wird deutlich, dass das Wachstum der Achsen (in der Graphik als Neuzuwachs bezeichnet) auf Kosten der drei basalen Abschnitte erfolgt.

In ihnen ist für alle Fraktionen die stärkste Abnahme zu verzeichnen, während der Anteil im Neuzuwachs kontinuierlich ansteigt (Abb. 3-3).



**Abb. 3-3: *Cuscuta reflexa***

**Veränderung des Kohlenhydratgehaltes in den einzelnen Achsenabschnitten während der Parasitierung von *Cuscuta*-Achsen an *Vicia faba*.**

Der Gesamtgehalt der einzelnen Kohlenhydrate in den Achsen wurde gleich 100% gesetzt und die Gehalte der einzelnen Abschnitte an den jeweiligen Versuchstagen auf diesen Wert bezogen.

n=4, mean ± SE

Die den Abbildungen zugrunde liegenden Werte sind in Tab. C im Anhang zusammengefasst.

Abschnitt 1 →	1 cm	0-1cm hinter der Spitze
Abschnitt x →	X cm	Neuzuwachs
Abschnitt 2 →	5 cm	20 cm vom basalen Ende
Abschnitt 3 →	5 cm	
Abschnitt 4 →	5 cm	
Abschnitt 5 →	5 cm	basales Ende

### 3.1.2 Untersuchungen zur Xylemtranslokation

#### 3.1.2.1 Translokation des Fluoreszenzfarbstoffs Texas red Dextran 3000

Zur mikroskopischen Darstellung des funktionellen Xylemanschlusses wurde der Xylemstrom mit Texas red Dextran 3000 markiert. Dazu wurde von für mindestens 14 Tage mit *Cuscuta* parasitierten *Vicia*-Pflanzen die Wurzel abgeschnitten und die Schnittfläche in die Farbstofflösung gestellt. Nach einer Translokationszeit von 90 Minuten wurden Handschnitte von der Haustorialregion angefertigt und mittels konfokaler *laser scanning* Mikroskopie ausgewertet. In der Abb. 3-4 ist ein Längsschnitt durch das *Cuscuta*-Haustorium im Spross von *Vicia faba* dargestellt. Das Fluoreszenzbild zeigt eine durchgehende Fluoreszenzmarkierung von den Leitbündeln des Wirtes über das Xylem des Haustoriums zu den Leitbündeln des Parasiten.

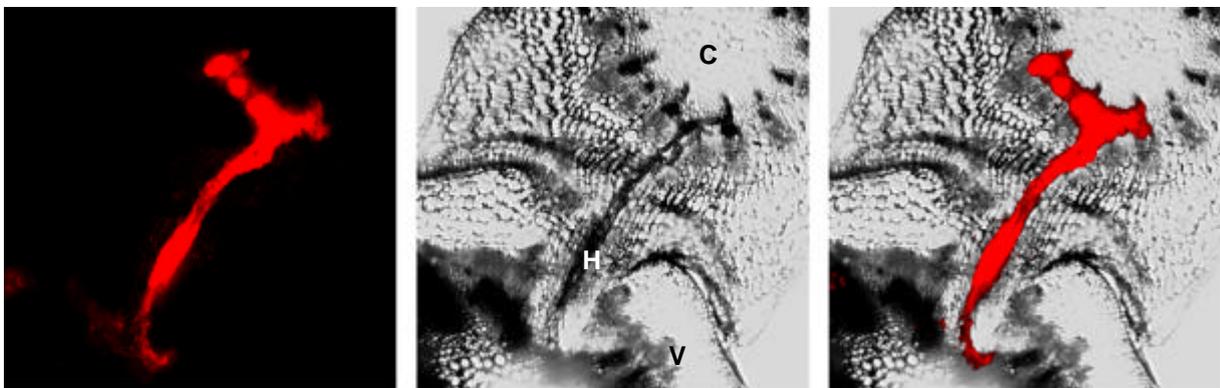


Abb. 3-4: *Vicia faba-Cuscuta reflexa*

**Transport von Texas red Dextran 3000 im Wirt-Parasit-System; Fluoreszenz- und Transmissionsaufnahmen von Querschnitten durch die Haustorialregion. Der Farbstoff wurde an den Wirt durch Einstellen in die Fütterungslösung appliziert. Versuchsdauer: 1,5 h.**

Innerhalb des Haustoriums ist das Xylem im Fluoreszenzbild als breiter roter, im Transmissionsbild als dunkler Strang sichtbar. Fluoreszenz zeigen auch die quergeschnittenen Leitbündel von Wirt und Parasit.

C=*Cuscuta*-Achse (quer), H=Haustorium (längs), V=*Vicia faba* (quer).

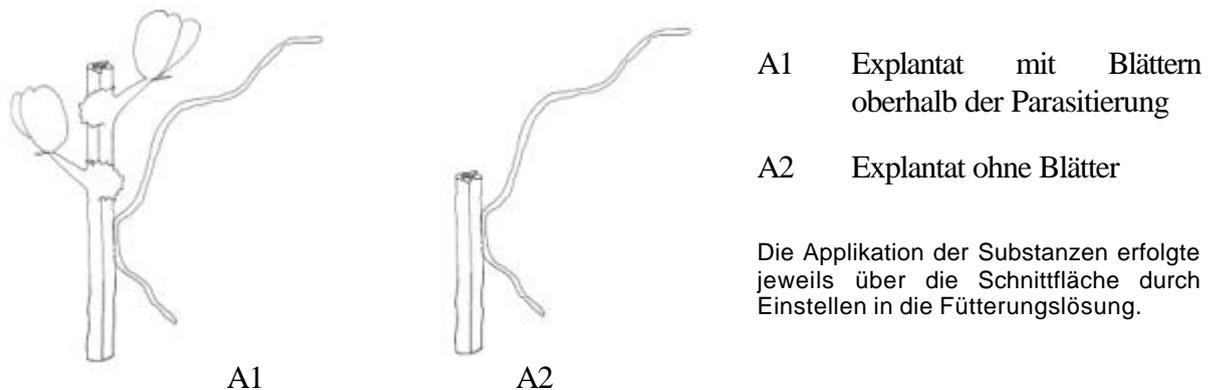
#### 3.1.2.2 Translokation von Aminosäuren und Xenobiotika

Mit nachstehenden Experimenten sollte geklärt werden, in welchem Umfang von der Wurzel des Wirts aufgenommene bzw. in ihr synthetisierte Substanzen über den Xylemanschluss in den Parasiten gelangen.

Bei Applikation von radioaktiv markierten Substanzen über intakte Wurzelsysteme müssen große Mengen an Radioaktivität appliziert werden, um bei geringen Translokationsraten nachweisbare Mengen in den oberirdischen Abschnitten und in der *Cuscuta* zu erreichen. Die Aufarbeitung der großen Wurzelmasse bringt zusätzliche methodische Probleme, dickere Wurzeln lassen sich schlecht zerkleinern und extrahieren.

Um diese Schwierigkeiten zu umgehen, wurden die folgenden Versuche an Explantaten durchgeführt. Dabei handelt es sich um Wirt-Parasit-Systeme, die auf das mit *Cuscuta* parasitierte Internodium und einen Stengelabschnitt oberhalb der Parasitierung mit zwei

Blättern reduziert wurden (Abb. 3-5A1) bzw. nur noch aus dem parasitierten Internodium und dem Parasiten bestanden (Abb. 3-5A2).



**Abb. 3-5:** Explantate des Wirt-Parasit-Systems *Vicia faba-Cuscuta reflexa* für die Untersuchungen zur Xylemtranslokation.

Die Applikation der zu untersuchenden Verbindungen erfolgte über die Schnittstelle der Explantate durch Einstellen in die Fütterungslösung für 24 Stunden.

Tab. 3-1 zeigt Aufnahme- und Translokationsraten sowie die Verteilungsmuster der nicht proteinogenen  $\alpha$ -Aminoisobuttersäure (AIB) und der Xenobiotika Diuron (DCMU), Atrazin und Glyphosat. Während Aufnahme- und Translokationsraten für alle vier Substanzen im gleichen Bereich liegen, weisen die Verteilungsmuster große Unterschiede auf. Diuron und Atrazin gelangen mit  $4,1 \pm 1,0$  % bzw.  $2,7 \pm 0,5$  % in einem wesentlich geringeren Umfang in den Parasiten als Glyphosat und AIB, für die Werte von  $29,5 \pm 3,8$  % bzw.  $34,7 \pm 6,5$  % ermittelt wurden.

Auch innerhalb des Parasiten sind die Substanzen unterschiedlich verteilt (Tab.3-2). Während Diuron zu  $74,5 \pm 4,9$  % und Atrazin zu  $78,0 \pm 6,9$  % im Haustorialstück verbleiben und nur 25,5 % bzw. 22,0 % in der freien Achse zu finden sind, liegen 87,1 % des transportierten Glyphosats bzw. 76,9 % der transportierten AIB in der freien Achse vor und zwar vorwiegend in der wachsenden Spitzenregion.

Tab. 3-1: *Vicia faba-Cuscuta reflexa*

Aufnahmeraten, Translokationsraten und Verteilungsmuster von  $^{14}\text{C}$ -DCMU,  $^{14}\text{C}$ -Atrazin,  $^{14}\text{C}$ -Glyphosat und  $^{14}\text{C}$ -AIB in Explantaten nach Applikation über die untere Schnittfläche. Versuchsdauer: 24 Stunden.

Substanz	prozentualer Anteil an transportierten $^{14}\text{C}$ -Verbindungen				
	AR (%)	TR (%)	<i>Vicia</i> -Achse	Blätter	<i>Cuscuta</i> gesamt
DCMU	87,0	89,3	45,7 ± 5,5	50,2 ± 5,2	4,1 ± 1,0
Atrazin	98,2	87,8	39,4 ± 9,6	57,9 ± 9,3	2,7 ± 0,5
Glyphosat	98,4	84,8	17,9 ± 2,4	52,6 ± 5,7	29,5 ± 3,8
AIB	83,1	98,7	47,7 ± 4,3	17,7 ± 3,9	34,7 ± 6,5

Das Wirt-Parasit-System wurde auf das durch *Cuscuta* parasitierte Internodium mit zwei Blättern oberhalb der Parasitierung reduziert (Abb. 3-5A1). Zur Berechnung der Verteilungsmuster wurde die Summe der Radioaktivität im Wirt-Parasit-System außerhalb der Fütterungsstelle=100% gesetzt und der Gehalt der einzelnen Abschnitte auf diesen Wert bezogen.

AR=Aufnahmerate, TR=Translokationsrate. n=8 (Glyphosat), n=10 (DCMU), n=4 (Atrazin), n=9 (AIB); mean ± SE

Tab. 3-2: *Vicia faba-Cuscuta reflexa*

Verteilungsmuster von  $^{14}\text{C}$ -DCMU,  $^{14}\text{C}$ -Atrazin,  $^{14}\text{C}$ -Glyphosat und  $^{14}\text{C}$ -AIB innerhalb der *Cuscuta*. Versuchsdauer: 24 Stunden.

Substanz	prozentualer Anteil an transportierten $^{14}\text{C}$ -Verbindungen	
	Haustorialstück	freie <i>Cuscuta</i> -Achse
DCMU	74,5 ± 4,9	25,5 ± 4,9
Atrazin	78,0 ± 6,9	22,0 ± 6,9
Glyphosat	12,9 ± 1,8	87,1 ± 1,8
AIB	23,1 ± 5,1	76,9 ± 5,1

Das Wirt-Parasit-System wurde auf das durch *Cuscuta* parasitierte Internodium mit zwei Blättern oberhalb der Parasitierung reduziert (Abb. 3-5A1). Zur Berechnung der Verteilungsmuster wurde die Summe der Radioaktivität in der gesamten *Cuscuta*=100% gesetzt und der Gehalt des Haustorialstücks und der freien Achse auf diesen Wert bezogen.; n=8 (Glyphosat), n=10 (DCMU), n=4 (Atrazin), n=9 (AIB), mean ± SE

Auch bei Applikation an Explantate ohne Blätter (Abb. 3-5A2) war der Anteil von Diuron in *Cuscuta* mit  $3,7 \pm 0,6$  % um ein vielfaches geringer als der von Glyphosat mit  $36,1 \pm 7,6$  % (Tab. 3-3). Die prozentuale Verteilung innerhalb des Parasiten ist mit der aus dem vorangegangenen Versuch vergleichbar. Glyphosat liegt hauptsächlich in der freien Achse, Diuron im Haustorialstück des Parasiten vor (Tab. 3-4).

Tab. 3-3: *Vicia faba-Cuscuta reflexa*

Verteilungsmuster von  $^{14}\text{C}$ -Glyphosat und  $^{14}\text{C}$ -DCMU in Explantaten ohne Blätter nach Applikation über die untere Schnittfläche. Versuchsdauer: 24 Stunden.

Substanz	prozentualer Anteil an transportierten $^{14}\text{C}$ -Verbindungen			
	Achse unterhalb der Parasitierung	Achse mit parasitierender <i>Cuscuta</i>	Achse oberhalb der Parasitierung	<i>Cuscuta</i> gesamt
Glyphosat	8,9 ± 2,3	12,4 ± 3,6	42,6 ± 6,8	36,1 ± 7,6
DCMU	73,4 ± 11,2	19,2 ± 12,2	3,8 ± 2,2	3,7 ± 0,6

Das Wirt-Parasit-System wurde auf das durch *Cuscuta* parasitierte Internodium reduziert (Abb. 35A2). Berechnung der Verteilungsmuster wie bei Tab. 3-1 angegeben., n=5 (Glyphosat), n=3 (DCMU), mean ± SE

Tab. 3-4: *Vicia faba-Cuscuta reflexa*

Verteilungsmuster von  $^{14}\text{C}$ -Glyphosat und  $^{14}\text{C}$ -DCMU innerhalb der *Cuscuta*. Versuchsdauer: 24 Stunden.

Substanz	prozentualer Anteil an transportierten $^{14}\text{C}$ -Verbindungen	
	Haustorialstück	freie <i>Cuscuta</i> -Achse
Glyphosat	15,0 ± 3,8	85,0 ± 3,8
DCMU	55,8 ± 7,3	44,2 ± 7,3

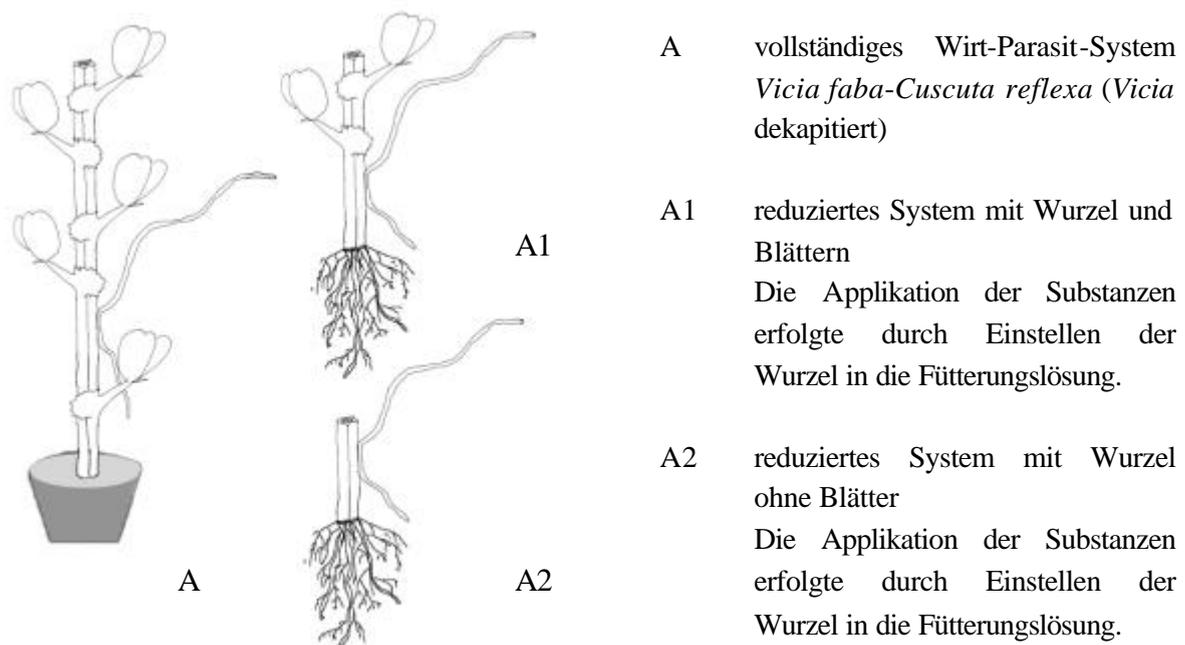
Das Wirt-Parasit-System wurde auf das durch *Cuscuta* parasitierte Internodium reduziert (Abb. 35A2). Berechnung der Verteilungsmuster wie bei Tab. 3-2 angegeben., n=5 (Glyphosat), n=3 (DCMU), mean ± SE

Da alle Experimente unter gleichen äußeren Bedingungen durchgeführt wurden, kann davon ausgegangen werden, dass die treibende Kraft für den Xylemstrom, die Transpiration der Wirtspflanze und der *Cuscuta*-Achse, auch in allen Versuchen annähernd gleich groß war. Der Einstrom in den Parasiten sollte daher für alle Verbindungen im gleichen Umfang erfolgen. Die vier Verbindungen unterscheiden sich jedoch in ihren Mobilitätseigenschaften. Während Diuron und Atrazin xylemmobil sind, gehören Glyphosat und AIB zu den ambimobilen Verbindungen. Sie können sowohl im Xylem als auch im Phloem transportiert werden. Ihr im Vergleich zu den xylemmobilen Verbindungen höherer Gehalt im Parasiten und ihre Verteilung entlang der Parasitenachse, mit Akkumulation in den *sink*-Abschnitten, könnte auf einen Transport über das Xylem **und** das Phloem in die *Cuscuta* zurückzuführen sein.

In unseren Experimenten erfolgte die Applikation über die offene Schnittfläche, dabei gelangen die Substanzen in die Xylemgefäße und in den Apoplasten des Stengels. Aus ihm

können die ambimobilen Verbindungen in das Phloem aufgenommen und in den Parasiten transportiert werden. Unter diesem Gesichtspunkt wäre die beobachtete unterschiedliche Verteilung der ambi- und xylemmobilen Verbindungen nur durch den Versuchsansatz bedingt und würde nicht den Verhältnissen im intakten Wirt-Parasit-System entsprechen.

Trotz der eingangs geschilderten methodischen Schwierigkeiten bei Applikation von radioaktiven Verbindungen an Pflanzen mit umfangreichen Wurzelsystemen wurden die an Explantaten durchgeführten Untersuchungen daher an bewurzelten Wirt-Parasit-Systemen, die oberhalb des parasitierten Internodiums noch zwei Blätter besaßen, wiederholt (Abb. 3-6A1).



**Abb. 3-6: *Vicia faba-Cuscuta reflexa***

#### **Versuchssysteme zur Untersuchung der Xylemtranslokation**

$^{14}\text{C}$ -AIB,  $^{14}\text{C}$ -Diuron und  $^{14}\text{C}$ -Glyphosat wurden an die von Erde freigespülten Wurzeln appliziert. Die Tabellen 3-5 und 3-6 zeigen die Ergebnisse.

Wie erwartet, waren Aufnahme- und Translokationsraten für alle Verbindungen wesentlich geringer als bei Applikation über die Schnittfläche von Explantaten (vergl. Tab. 3-1 und 3-5).

Auch die in den Parasiten transportierten Anteile sind für alle Verbindungen geringer als bei den Experimenten mit Explantaten. Die Verteilungsmuster beider Versuchsreihen unterscheiden sich jedoch nicht. Die in den wurzellosen Explantaten zwischen den xylem- und ambimobilen Substanzen festgestellten Unterschiede werden auch hier sichtbar. Das xylemmobile DCMU wird mit  $0,9 \pm 0,5$  % auch in diesem Versuchsansatz nur in sehr geringem Umfang in den Parasiten transportiert, während die ambimobilen Verbindungen mit  $15,3 \pm 0,5$  % für Glyphosat und  $14,9 \pm 3,9$  % für AIB wiederum einen wesentlich höheren Anteil in der *Cuscuta* aufweisen.

Tab. 3-5: *Vicia faba-Cuscuta reflexa*

Aufnahmeraten, Translokationsraten und Verteilungsmuster von  $^{14}\text{C}$ -DCMU,  $^{14}\text{C}$ -Glyphosat und  $^{14}\text{C}$ -AIB im Wirt-Parasit-System nach Applikation über die Wurzel der Wirtspflanze. Versuchsdauer: 24 Stunden.

Substanz	AR (%)	TR (%)	prozentualer Anteil an transportierten $^{14}\text{C}$ -Verbindungen		
			Vicia-Achse	Blätter	<i>Cuscuta</i> gesamt
DCMU	69,0	19,9	93,2 ± 2,2	5,9 ± 2,4	0,9 ± 0,5
Glyphosat	55,2	25,0	19,4 ± 7,4	65,3 ± 7,7	15,3 ± 0,5
AIB	71,2	18,5	72,7 ± 8,4	12,4 ± 5,3	14,9 ± 3,9

Zur Berechnung der Verteilungsmuster wurde die Summe der Radioaktivität im Wirt-Parasit-System außerhalb der Wurzel=100% gesetzt und der Gehalt der einzelnen Abschnitte auf diesen Wert bezogen.  
AR=Aufnahmerate, TR=Translokationsrate, n=4 (DCMU, Glyphosat), n=3 (AIB), mean ± SE

Bei Betrachtung der Verteilungsmuster innerhalb der *Cuscuta* sind ebenfalls Parallelen zu den Explantat-Experimenten erkennbar. So kommt es auch hier zur Akkumulation des nur im Xylem transportierten Diuron im Haustorialstück ( $82,4 \pm 1,5$  %), während sich der Hauptteil der ambimobilen Substanzen mit  $81,7 \pm 5,4$  % (Glyphosat) bzw.  $78,3 \pm 2,7$  % (AIB) wiederum in der freien Achse befindet (Tab. 3-6).

Tab. 3-6: *Vicia faba-Cuscuta reflexa*

Verteilungsmuster von  $^{14}\text{C}$ -DCMU,  $^{14}\text{C}$ -Glyphosat und  $^{14}\text{C}$ -AIB innerhalb der *Cuscuta* nach Applikation über die Wurzel der Wirtspflanze. Versuchsdauer: 24 Stunden.

Substanz	prozentualer Anteil an transportierten $^{14}\text{C}$ -Verbindungen	
	Haustorialstück	freie <i>Cuscuta</i> -Achse
DCMU	82,4 ± 1,5	17,6 ± 1,5
Glyphosat	18,3 ± 5,4	81,7 ± 5,4
AIB	21,7 ± 2,7	78,3 ± 2,7

Zur Berechnung der Verteilungsmuster wurde die Summe der Radioaktivität in der gesamten *Cuscuta*=100% gesetzt und der Gehalt des Haustorialstücks und der freien Achse auf diesen Wert bezogen.  
n=4 (DCMU, Glyphosat), n=3 (AIB), mean ± SE

Damit kann ausgeschlossen werden, dass die in den Experimenten mit Explantaten erhaltenen Ergebnisse durch die Applikationsmethode bedingt waren. Auch bei Applikation über die Wurzel gelangen die untersuchten Verbindungen über unterschiedliche Transportsysteme in den Parasiten. Diuron und Atrazin ausschließlich über das Xylem, Glyphosat und AIB auch über das Phloem. Das setzt einen Xylem-Phloem-Transfer der durch die Wurzel aufgenommenen ambimobilen Verbindungen voraus. Dieser könnte in den an der *Vicia* belassenen ausgewachsenen und daher als source für den Assimilattransport fungierenden Blätter erfolgen. Um das zu prüfen, benutzten wir Wirt-Parasit-Systeme, die nur noch aus dem mit *Cuscuta* parasitierten Internodium und der Wurzel bestanden (Abb. 3-6A2).

Nach Auswertung dieser Versuche wurde ein unverändert hoher Anteil an transportierter AIB und Glyphosat in *Cuscuta* gemessen (Tab. 3-7). Die prozentualen Anteile von  $19,0 \pm 9,8$  % für Glyphosat und  $11,7 \pm 4,7$  % für AIB entsprachen den Werten in den Versuchssystemen mit Blättern.

**Tab. 3-7: *Vicia faba-Cuscuta reflexa***

**Verteilungsmuster von  $^{14}\text{C}$ -Glyphosat und  $^{14}\text{C}$ -AIB im Wirt-Parasit-System ohne Blätter nach Applikation über die Wurzel der Wirtspflanze. Versuchsdauer: 24 Stunden.**

Substanz	prozentualer Anteil an transportierten $^{14}\text{C}$ -Verbindungen	
	<i>Vicia</i> -Achse	<i>Cuscuta</i> gesamt
Glyphosat	$81,0 \pm 9,8$	$19,0 \pm 9,8$
AIB	$88,3 \pm 4,7$	$11,7 \pm 4,7$

Das Wirt-Parasit-System wurde entsprechend Abb. 3-6A2 reduziert. Berechnung der Verteilungsmuster wie bei Tab. 3-5 angegeben., n=3, mean  $\pm$  SE.

Auch innerhalb des Parasiten lag wie in den Experimenten mit bewurzelten Systemen, der Hauptanteil der transportierten radioaktiven Verbindungen in der freien Achse vor (Tab. 3-8).

**Tab. 3-8: *Vicia faba-Cuscuta reflexa***

**Verteilungsmuster von  $^{14}\text{C}$ -Glyphosat und  $^{14}\text{C}$ -AIB innerhalb der *Cuscuta* nach Applikation über die Wurzel von Wirtspflanzen ohne Blätter. Versuchsdauer: 24 Stunden.**

Substanz	prozentualer Anteil an transportierten $^{14}\text{C}$ -Verbindungen	
	Haustorialstück	freie <i>Cuscuta</i> -Achse
Glyphosat	$20,3 \pm 5,3$	$79,7 \pm 5,3$
AIB	$29,5 \pm 2,5$	$70,5 \pm 2,5$

Berechnung der Verteilungsmuster wie bei Tab. 3-6 angegeben., n=3, mean  $\pm$  SE.

Damit kann eine Umladung in den Blättern ausgeschlossen werden. Der Transfer der Substanzen aus dem Xylem in das Phloem erfolgt offensichtlich bereits in der Wurzel oder im Spross der Wirtspflanze.

Einen endgültigen Beweis für zwei unterschiedliche Transportwege, über die xylem- und ambimobile Substanzen nach Wurzelapplikation in den Parasiten gelangen, brachten Experimente, bei denen  $^{14}\text{C}$ -markiertes Diuron und  $^3\text{H}$ -markierte  $\alpha$ -Aminoisobuttersäure (AIB) gemeinsam an *eine* Pflanze appliziert wurden. Auch in diesem Experiment, unter völlig identischen äußeren (Temperatur, Luftfeuchtigkeit) und physiologischen Bedingungen (Wasserpotential der Versuchspflanze, *source-sink-relations*), wurden die aus allen bisherigen Untersuchungen erhaltenen Verteilungsmuster sowohl im gesamten Wirt-Parasit-System (Tab. 3-9) als auch innerhalb des Parasiten bestätigt (Tab. 3-10).

**Tab. 3-9: *Vicia faba-Cuscuta reflexa***

**Verteilungsmuster von  $^3\text{H}$ -AIB und  $^{14}\text{C}$ -DCMU in Explantaten nach simultaner Applikation über die untere Schnittfläche. Versuchsdauer: 24 Stunden.**

Substanz	prozentualer Anteil an transportierten $^{14}\text{C}$ -Verbindungen		
	<i>Vicia</i> -Achse	Blätter	<i>Cuscuta</i> gesamt
AIB	59,4 ± 6,3	9,5 ± 2,1	31,2 ± 6,1
DCMU	77,6 ± 4,3	14,7 ± 3,2	7,7 ± 1,8

Das Wirt-Parasit-System wurde auf das durch *Cuscuta* parasitierte Internodium mit zwei Blättern oberhalb der Parasitierung reduziert. Zur Berechnung der Verteilungsmuster wurde die Summe der Radioaktivität im Wirt-Parasit-System außerhalb der Fütterungsstelle=100% gesetzt und der Gehalt der einzelnen Abschnitte auf diesen Wert bezogen. n=6, mean ± SE

**Tab. 3-10: *Vicia faba-Cuscuta reflexa***

**Verteilungsmuster von  $^3\text{H}$ -AIB und  $^{14}\text{C}$ -DCMU in der *Cuscuta* nach simultaner Applikation über die untere Schnittfläche der Explantate. Versuchsdauer: 24 Stunden.**

Substanz	prozentualer Anteil an transportierten $^{14}\text{C}$ -Verbindungen	
	Haustorialstück	freie <i>Cuscuta</i> -Achse
AIB	25,6 ± 1,6	74,4 ± 1,6
DCMU	85,4 ± 4,1	14,6 ± 4,1

Das Wirt-Parasit-System wurde auf das durch *Cuscuta* parasitierte Internodium mit zwei Blättern oberhalb der Parasitierung reduziert. Berechnung der Verteilungsmuster wie bei Tab. 3-2; n=6, mean ± SE

In Abb. 3-7 sind die Ergebnisse beider Versuchssysteme (bewurzelte Wirtspflanzen und Explantate mit bzw. ohne Blätter) zusammengefasst und vergleichend dargestellt.

Wie zu erkennen, ist der prozentuale Anteil der ambimobilen Verbindungen (AIB, Glyphosat) in der *Cuscuta*, unabhängig vom Vorhandensein der Blätter, etwa gleich groß. Auch das Verteilungsmuster der transportierten Substanzen innerhalb der *Cuscuta* ist bei beiden Versuchssystemen gleich. Die ausschließlich im Xylem mobilen Substanzen Diuron und Atrazin werden zu einem deutlich geringeren Prozentsatz als die ambimobilen Verbindungen AIB und Glyphosat in die *Cuscuta* transportiert und zeigen auch innerhalb des Parasiten eine andere Verteilung.

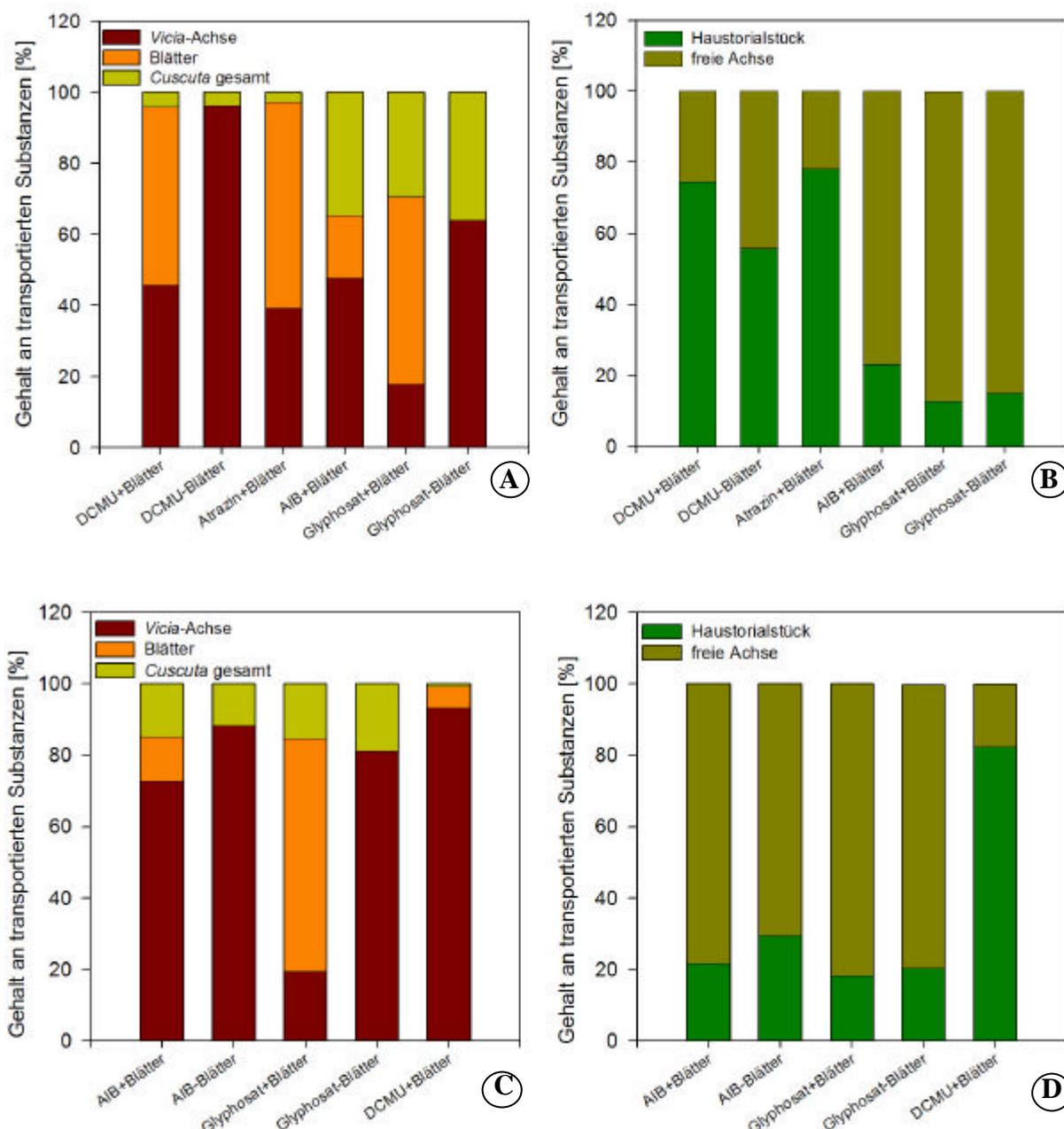


Abb. 3-7: *Vicia faba-Cuscuta reflexa*

Verteilungsmuster der im Xylem mobilen Substanzen DCMU und Atrazin bzw. der ambimobilen Substanzen AIB und Glyphosat in unterschiedlichen Versuchssystemen.

- (A+B) wurzellose Wirt-Parasit-Systeme (Explantate)  
 (A) Verteilungsmuster der Substanzen im gesamten Wirt-Parasit-System  
 (B) Verteilungsmuster der Substanzen in der *Cuscuta*  
 (C+D) bewurzelte Wirt-Parasit-Systeme  
 (C) Verteilungsmuster der Substanzen im gesamten Wirt-Parasit-System  
 (D) Verteilungsmuster der Substanzen in der *Cuscuta*

Substanz + Blätter = Wirtspflanze mit Blätter  
 Substanz – Blätter = Wirtspflanze ohne Blätter

Zur Berechnung der Verteilungsmuster wurde bei (A+C) die Summe der Radioaktivität im Wirt-Parasit-System außerhalb der Wurzel bzw. Fütterungsstelle, bei (B+D) in der gesamten *Cuscuta*=100% gesetzt und der Gehalt der einzelnen Abschnitte auf diesen Wert bezogen.; Versuchsdauer: 24 Stunden

Die den Abbildungen zugrunde liegenden Werte sind in Tab. D im Anhang zusammengefasst.

### 3.1.2.3 Translokation des Schwermetalls Cadmium

*Cuscuta reflexa* wurde für diese Untersuchungen zunächst auf *Vicia faba* bis zur vollständigen Ausbildung eines funktionellen Anschlusses (etwa 14 Tage) kultiviert.

Für die Applikation der Schwermetall-Lösung wurden die Wurzeln der *Vicia*-Pflanze von Erde freigespült und das Wirt-Parasit-System ohne Reduzierungen hydroponisch für 6 Tage in einer 1 mM Cadmiumchlorid-Lösung weiter kultiviert. Danach erfolgte die Aufteilung des Systems in:

- freie *Cuscuta*-Achse
- Blätter oberhalb der Parasitierung
- *Vicia*-Achse oberhalb der Parasitierung
- *Cuscuta* Haustorialstück ohne Haustorialkeile
- *Vicia*-Achse parasitiert mit Haustorialkeilen.

Durch Atom-Absorptions-Spektroskopie (AAS) wurde der Cadmiumgehalt in den einzelnen Abschnitten bestimmt (Abb. 3-8A). 89,9 % des aus der Wurzel austransportierten Schwermetalls verbleiben in der Wirtspflanze, nur 10,1 % gelangen in den Parasiten (Abb. 3-8B). Dieser Wert liegt im gleichen Größenbereich wie die für Diuron und Atrazin bestimmten Anteile. Auch innerhalb der *Cuscuta*-Achse liegt eine ähnliche Verteilung zwischen Haustorialstück und freier *Cuscuta*-Achse wie für Diuron und Atrazin vor.

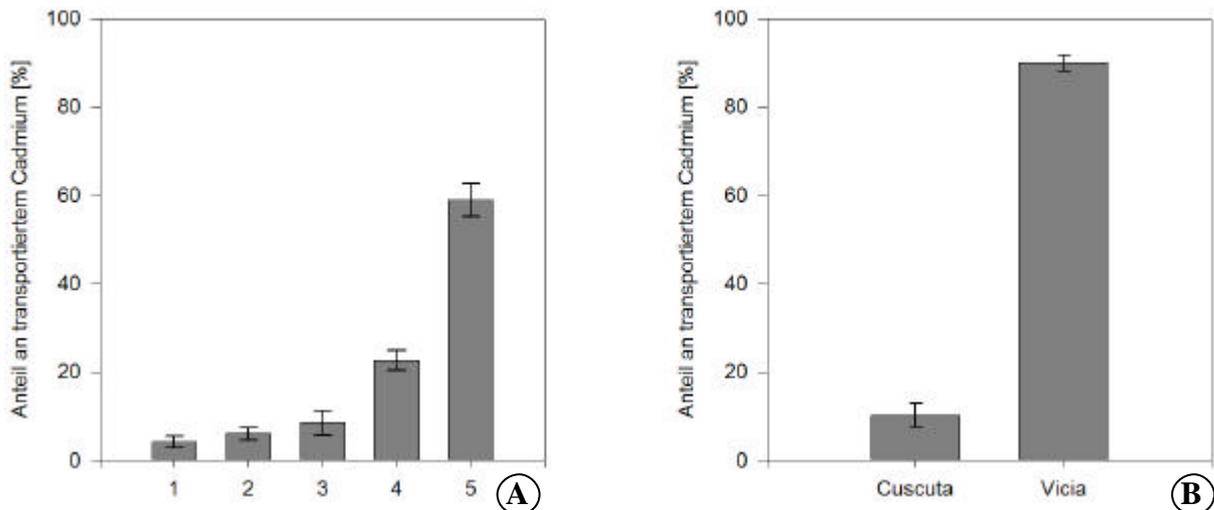


Abb. 3-8: *Vicia faba-Cuscuta reflexa*

Verteilungsmuster von Cadmium nach Applikation von  $\text{CdCl}_2$  an die Wurzel der Wirtspflanze  
Versuchsdauer: 6 Tage.

(A) Prozentualer Anteil der einzelnen Abschnitte des Wirt-Parasit-Systems an transportiertem Cadmium;

1=freie *Cuscuta*-Achse (durchschnittliche Länge 49 cm), 2=Blätter oberhalb der Parasitierung, 3=*Vicia*-Achse oberhalb der Parasitierung, 4=*Cuscuta* Haustorialstück ohne Haustorialkeile, 5=parasitierte *Vicia*-Achse mit inserierten Haustorialkeilen.

(B) Verteilung des aus der Wurzel austtransportierten Cadmiums zwischen Wirt und Parasit;

Die Bestimmung des Cadmium-Gehaltes erfolgte durch AAS. Zur Berechnung der Verteilungsmuster wurde der im Wirt-Parasit-System außerhalb der Wurzel gemessene Gehalt =100% gesetzt und der Gehalt der einzelnen Abschnitte auf diesen Wert bezogen., n=6, mean  $\pm$  SE

Die den Abbildungen zugrunde liegenden Werte sind in Tab. E im Anhang zusammengefasst.

### 3.1.2.4 Translokation des Alkaloids Nicotin

Um zu prüfen, ob und in welchem Umfang von der Wirtspflanze in der Wurzel synthetisierte Alkaloide in den Parasiten gelangen, wurde *Cuscuta reflexa* für vier Wochen auf *Nicotiana tabacum* im natürlichen gewundenen Induktionsmodus kultiviert. Der Parasit entwickelte während dieser Zeit kräftige Achsen, die äußerlich keinerlei Schädigung erkennen ließen (Abb. 3-9). Sie wurden nach Ablauf der Versuchszeit geerntet und für die Nicotinbestimmung, wie unter 2.6 beschrieben, aufgearbeitet. Dabei wurden Mischproben aus mehreren Achsen angefertigt. Parallel dazu wurden Proben aus den Blättern der Wirtspflanze untersucht. Durch Elektrospray-Massenspektroskopie konnte das Alkaloid eindeutig in *Cuscuta* nachgewiesen werden. Das in Abb. 3-10 dargestellte Massenspektrum des *Cuscuta*-Extraktes ist sowohl mit dem Spektrum des Blattextraktes von *Nicotiana tabacum* als auch mit dem Spektrum für Nicotin aus der Datenbank identisch.

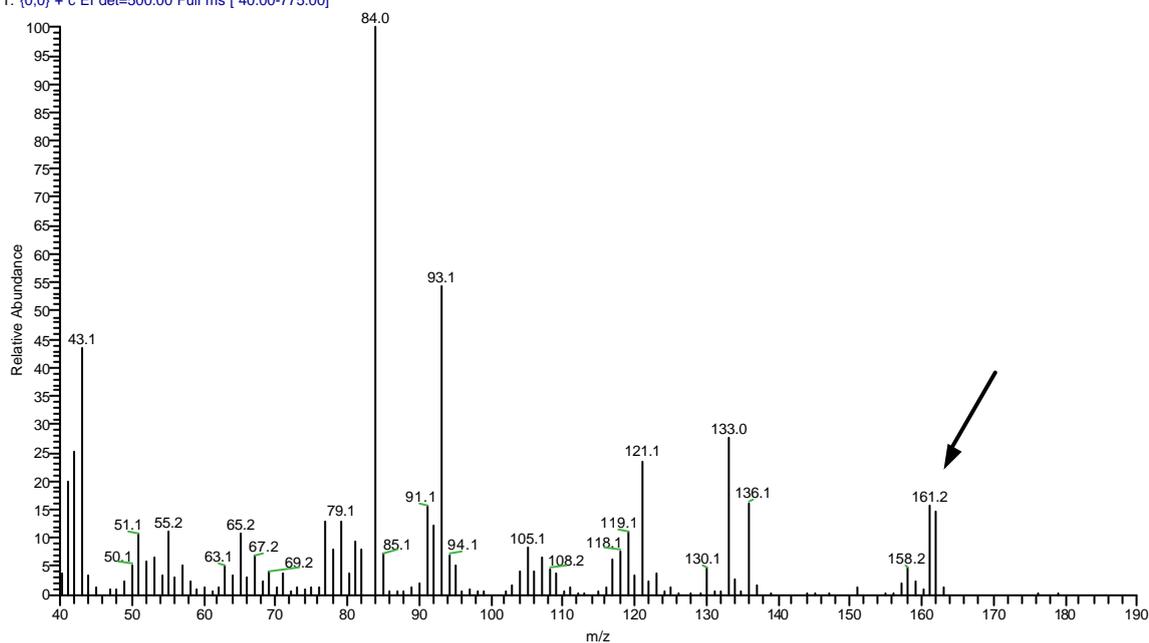


Abb. 3-9:

*Nicotiana tabacum-Cuscuta reflexa*

**Kräftige Achsen des Parasiten zeugen von einem erfolgreichen Anschluss an das vasculäre System des Wirtes.**

Cuscuta1-1#367-371 RT: 9.08-9.12 AV: 5 SB: 24 8.85-8.95, 9.33-9.47 NL: 6.73E5  
T: (0,0) + c EI det=500.00 Full ms [ 40.00-775.00]

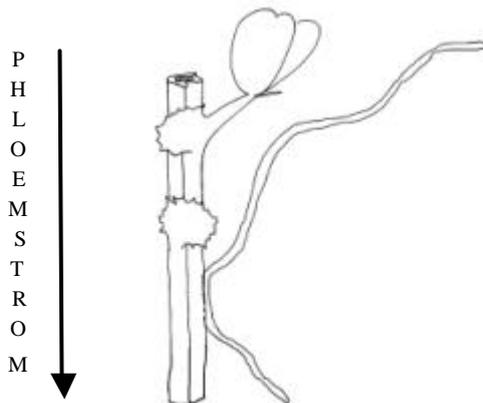
Abb. 3-10: *Nicotiana tabacum-Cuscuta reflexa*

**Massenspektrum des *Cuscuta*-Extraktes. Massenpeak (Pfeil) und Fragmentierung sind identisch mit dem Massenspektrum für Nicotina aus der Datenbank.**

### 3.1.3 Untersuchungen zur Phloemtranslokation

#### 3.1.3.1 Translokation von Saccharose und Xenobiotika

Bei diesen Experimenten verwendeten wir wie bei den Versuchen zur Xylemtranslokation reduzierte Wirt-Parasit-Systeme ohne Wurzel, jedoch mit nur *einem* Blatt oberhalb der Parasitierung (Abb. 3-11). Die Applikation der Substanzen erfolgte durch Auftropfen auf die Spreite des an der parasitierten Flanke inserierten Blattes. Eine wichtige Voraussetzung für die Durchführung der Versuche war ein intakter Phloemstrom aus dem Blatt in Richtung Parasit. Um den bei Reduzierung des Versuchssystems durch Verletzung schnell eintretenden Verschluss der Siebröhren zu verhindern, wurden die Explantate für 30 Minuten in eine Lösung von 10 mM EDTA/ 10 mM MES-NaOH (pH 5) und anschließend in eine EDTA-freie Pufferlösung eingestellt.



**Abb. 3-11:**

*Vicia faba-Cuscuta reflexa*

**Explantat zur Untersuchung der Phloemtranslokation**

Die Applikation der Substanzen erfolgte über das Blatt durch Auftropfen der Lösungen. Das Explantat stand während des Versuchs in einer Pufferlösung.

Die Funktionalität des Systems wurde mit  $^3\text{H}$ -markierter Saccharose, der Hauptform der im Wirt-Parasit-System transportierten Assimilate, getestet.

Bei einer Versuchsdauer von 3 Stunden wurden  $72,6 \pm 8,0$  % der aufgenommenen Saccharose aus dem Blatt austransportiert,  $23,6 \pm 7,4$  % bis in die Pufferlösung. Letzteres ist ein Beweis für einen funktionellen vom Blatt basipetal gerichteten Phloemstrom (Abb. 3-11).

Innerhalb des Explantates enthielten der parasitierte *Vicia*-Stengelabschnitt mit  $41,3 \pm 1,8$  % und die *Cuscuta* mit  $35,6 \pm 2,4$  % die höchsten Anteile an den transportierten Verbindungen (Tab. 3-11). *Cuscuta* ist also auch in diesem Versuchssystem ein deutlicher *sink* und bestimmt die Richtung des Assimilatstromes.

Tab. 3-11: *Vicia faba-Cuscuta reflexa*Verteilungsmuster von  $^3\text{H}$ -Saccharose im Wirt-Parasit-System. Versuchsdauer: 3 Stunden.

Abschnitt	prozentualer Anteil an transportierter $^3\text{H}$ -Saccharose innerhalb des Wirt-Parasit-Systems
<i>Vicia</i> oberhalb Parasitierung	11,0 ± 1,2
<b><i>Cuscuta</i> gesamt</b>	<b>35,6 ± 2,4</b>
<i>Vicia</i> parasitiert	41,3 ± 1,8
<i>Vicia</i> unterhalb Parasitierung	12,1 ± 1,8

$^3\text{H}$ -Saccharose wurde auf das Blatt oberhalb der Parasitierung appliziert. Zur Berechnung des Verteilungsmusters wurde die Summe der Radioaktivität im Wirt-Parasit-System außerhalb des Blattes=100% gesetzt und der Gehalt der einzelnen Abschnitte auf diesen Wert bezogen. n=10, mean ± SE

In weiteren Experimenten wurden neben Saccharose als phloemmobile biotische Substanz 2-Methyl-4-chlorphenoxyessigsäure (MCPA) und Glyphosat als phloem- bzw. ambimobile Vertreter xenobiotischer Verbindungen an den Wirt appliziert. Dabei sollte geprüft werden, ob *Cuscuta* in der Lage ist, aus den im Phloem des Wirtes transportierten Substanzen auszuwählen, indem, z.B. bei einem apoplastischen Transfer, die biotischen, für den Stoffwechsel notwendigen Verbindungen, bevorzugt in die Absorptionshyphen aufgenommen werden.

Um in allen Experimenten gleiche äußere und physiologische Bedingungen zu gewährleisten, wurden das  $^{14}\text{C}$ -markierte Xenobiotikum und die  $^3\text{H}$ -markierte Saccharose als Substanzgemisch simultan an die Wirtspflanze appliziert. Die Konzentration der Xenobiotika lag bei 1 mM, der Phloemstrom wurde durch sie nicht beeinflusst. Die Translokationsraten von Saccharose mit 71,4 ± 3,9 % (Saccharose/Glyphosat-Applikation) bzw. 76,7 ± 5,3 % (Saccharose/MCPA-Applikation) entsprachen den Werten bei Einzelapplikation von Saccharose (72,6 ± 8,0 %).

Beim Vergleich der Verteilungsmuster innerhalb des Explantates fällt auf, dass unabhängig von chemischer Struktur und physiologischer Wirkung die Verbindungen stets in gleichen Anteilen im Parasiten vorlagen (Abb. 3-12A).

Auch die Verteilung innerhalb der *Cuscuta*-Achse ergab keine signifikanten Unterschiede in der Verteilung von Saccharose und Xenobiotikum. Sowohl im Haustorialstück als auch in der freien Achse wurden für die simultan applizierten Verbindungen übereinstimmende prozentuale Anteile gemessen (Abb. 3-12B).

Da der Transport von Saccharose und Xenobiotika in *derselben* Pflanze und unter *denselben* Bedingungen stattfand, kann damit eine Selektivität beim Transfer zwischen dem Phloem des Wirtes und des Parasiten durch einen Membrantransport ausgeschlossen werden. Die Ergebnisse sprechen vielmehr für einen symplastischen, durch keine Membranbarrieren behinderten oder regulierten Transport zwischen Wirt und Parasit.

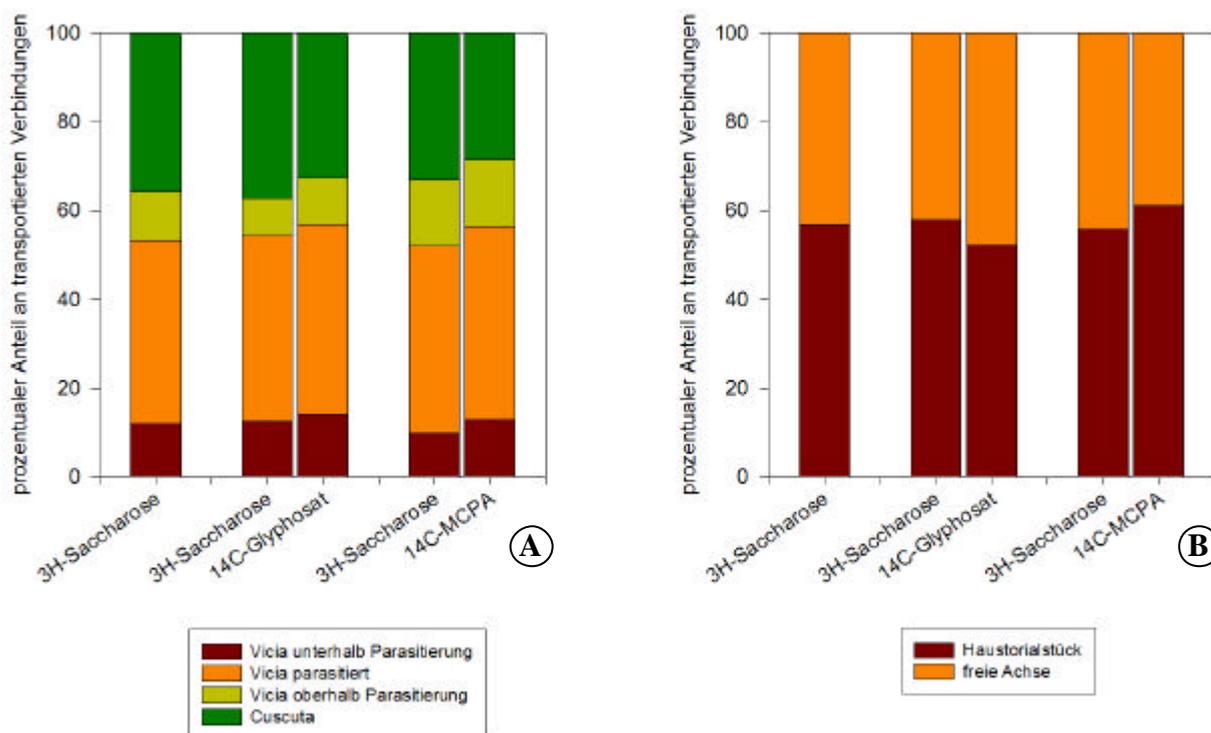


Abb. 3-12: *Vicia faba-Cuscuta reflexa*

Verteilungsmuster von  $^3\text{H}$ -Saccharose und  $^{14}\text{C}$ -Xenobiotika im Wirt-Parasit-System (A) und im Parasiten (B).

$^3\text{H}$ -Saccharose und  $^{14}\text{C}$ -Xenobiotikum wurden auf das Blatt oberhalb der Parasitierung als Substanzgemisch appliziert. Zur Berechnung des Verteilungsmusters wurde bei (A) die Summe der Radioaktivität im Wirt-Parasit-System außerhalb des Blattes, bei (B) in der gesamten *Cuscuta*=100% gesetzt und der Gehalt der einzelnen Abschnitte auf diesen Wert bezogen. Die erste Säule in beiden Abbildungen zeigt zum Vergleich die bei Einzelapplikation von  $^3\text{H}$ -Saccharose erhaltenen Werte.

Die den Abbildungen zugrunde liegenden Werte sind in Tab. F im Anhang zusammengefasst.;

Einzelapplikation von  $^3\text{H}$  Saccharose n=9, Applikation der Substanzgemische n=10; mean  $\pm$  SE

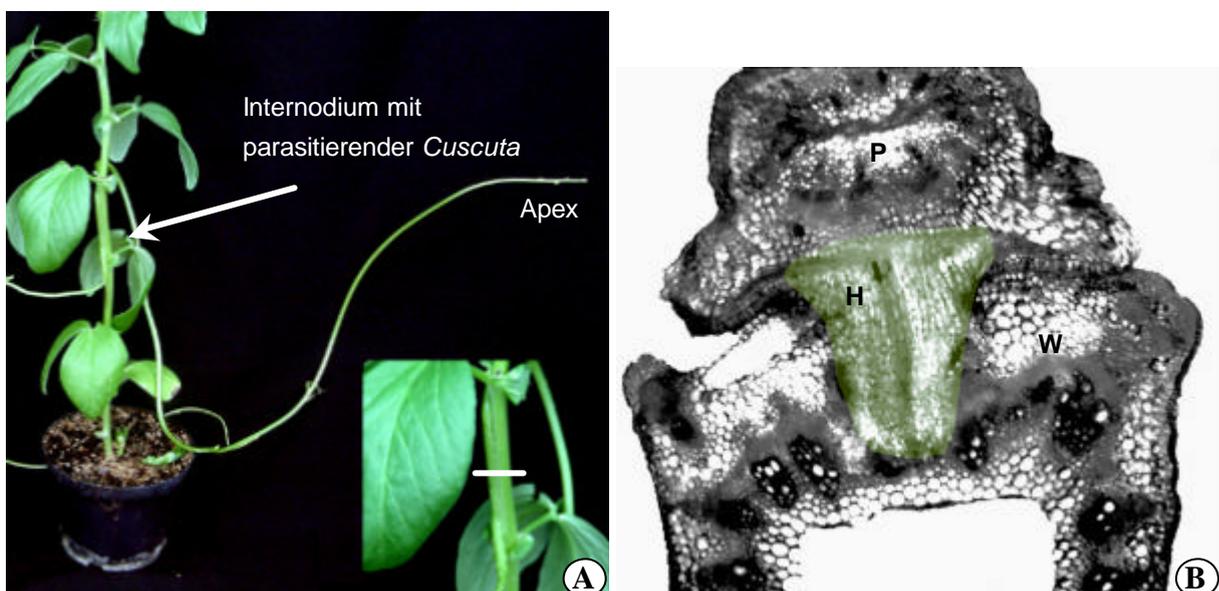
### 3.1.3.2 Translokation der Fluoreszenzfarbstoffe CF und HPTS

Zur Markierung des Phloemstromes und zum Nachweis symplastischer Verbindungen zwischen einzelnen Zellen werden seit einigen Jahren sehr erfolgreich die Fluoreszenzfarbstoffe 5(6)-Carboxyfluorescein (CF) und 8-Hydroxypyren-1,3,6-trisulfonsaures-Natrium (HPTS) eingesetzt. Da ihre Aufnahme wegen ihrer großen Hydrophilie nur sehr begrenzt ist, werden sie als lipophilere, aber nicht fluoreszierende Ester appliziert. Nach Aufnahme in die Zellen bzw. nach Beladung des Phloems werden diese durch intrazelluläre Esterasen in die freien, fluoreszierenden Säuren gespalten, die mit den Assimilaten zu den *sinks* transportiert werden. Ihre Verteilung erfolgt nach dem gleichen Muster wie das der anderen im Phloem transportierten Stoffe. Aufgrund ihrer Hydrophilie können sie das Phloem entlang des *path* durch seitlichen Membrantransport nicht verlassen, ihre Entladung in den *sinks*, z.B. in jungen Blättern, kann nur über Plasmodesmen in das umliegende Gewebe erfolgen.

Wir konnten mit diesen Farbstoffen den Weg der im Phloem transportierten Stoffe aus dem Blatt des Wirtes bis in den Parasiten mikroskopisch darstellen.

Die Untersuchungen erfolgten an *Vicia faba*-Pflanzen, die an der Sprossachse für mindestens 14 Tage mit *Cuscuta reflexa* parallel parasitiert waren (Abb. 3-13A). Zur besseren Aufnahme der Farbstoffe wurde die obere Epidermis der *Vicia*-Blätter mit feinem Sandpapier aufgeraut und nach Auftropfen der Farbstofflösung mit Haushaltsfolie abgedeckt. Dadurch sollte der Turgor erhalten sowie ein Eintrocknen und Herabtropfen der Fluoreszenzfarbstoffe vermieden werden.

Die Auswertung erfolgte nach 2,5-3 Stunden mittels konfokaler *laser scanning* Mikroskopie. Dazu wurden Handschnitte durch die Haustorialregion angefertigt. Der Balken in der Ausschnittsvergrößerung Abb. 3-13A gibt die Schnittrichtung an. Der *Vicia*-Stengel und die *Cuscuta*-Achse werden quer, das sich im *Vicia*-Parenchym befindliche Haustorium längs geschnitten (Abb. 3-13B).



**Abb. 3-13: *Vicia faba*-*Cuscuta reflexa***

#### **Versuchssystem zur Untersuchung des Transports von Fluoreszenzfarbstoffen.**

Die Ausschnittsvergrößerung in (A) zeigt das Internodium mit der im parallelen Induktionsmodus parasitierenden *Cuscuta*. Der Balken gibt die Schnittrichtung bei Anfertigung der Handschnitte an. Das dabei erhaltene Bild ist in (B) dargestellt. Wirts- und Parasiten-Achse werden jeweils quer, das Haustorium (leicht grün eingefärbt) dagegen längs geschnitten. P=Parasiten-Achse=*Cuscuta reflexa* (quer), H=Haustorialkeil (längs), W=Wirts-Achse=*Vicia faba* (quer).

Die Auswertung der Fluoreszenzaufnahmen ergab für beide Farbstoffe übereinstimmende Bilder. In der Abb. 3-14 sind jeweils die Fluoreszenzaufnahme, die Transmissionsaufnahme und die Kombination beider Aufnahmen dargestellt.

Für beide Farbstoffe, CF (Abb. 3-14A) und HPTS (Abb. 3-14B), kann in den durch *Cuscuta* parasitierten Leitbündeln eine gegenüber den nicht parasitierten Bündeln stärkere Fluoreszenz beobachtet werden. Das in der Mitte des Haustoriums im Transmissionsbild dunkel erscheinende Xylem ist frei von Farbstoff, dagegen zeigen die rechts und links von ihm befindlichen Zellen eine CF- bzw. HPTS-Fluoreszenz. Sie entsprechen den Phloemelementen. Die Leitbündel im Haustorium besitzen, wie aus dem Querschnitt in Abb. 3-15A ersichtlich,

großlumige zentrale Xylemelemente, die allseitig von zahlreichen Phloemelementen aus Siebröhren und Geleitzellen (Abb. 3-15B) umgeben sind.

Eine durchgehende Fluoreszenzmarkierung ausgehend vom Phloem des Wirtes über das Phloem im Haustorium bis zum Phloem des Parasiten ist in Abb. 3-14 deutlich zu erkennen.

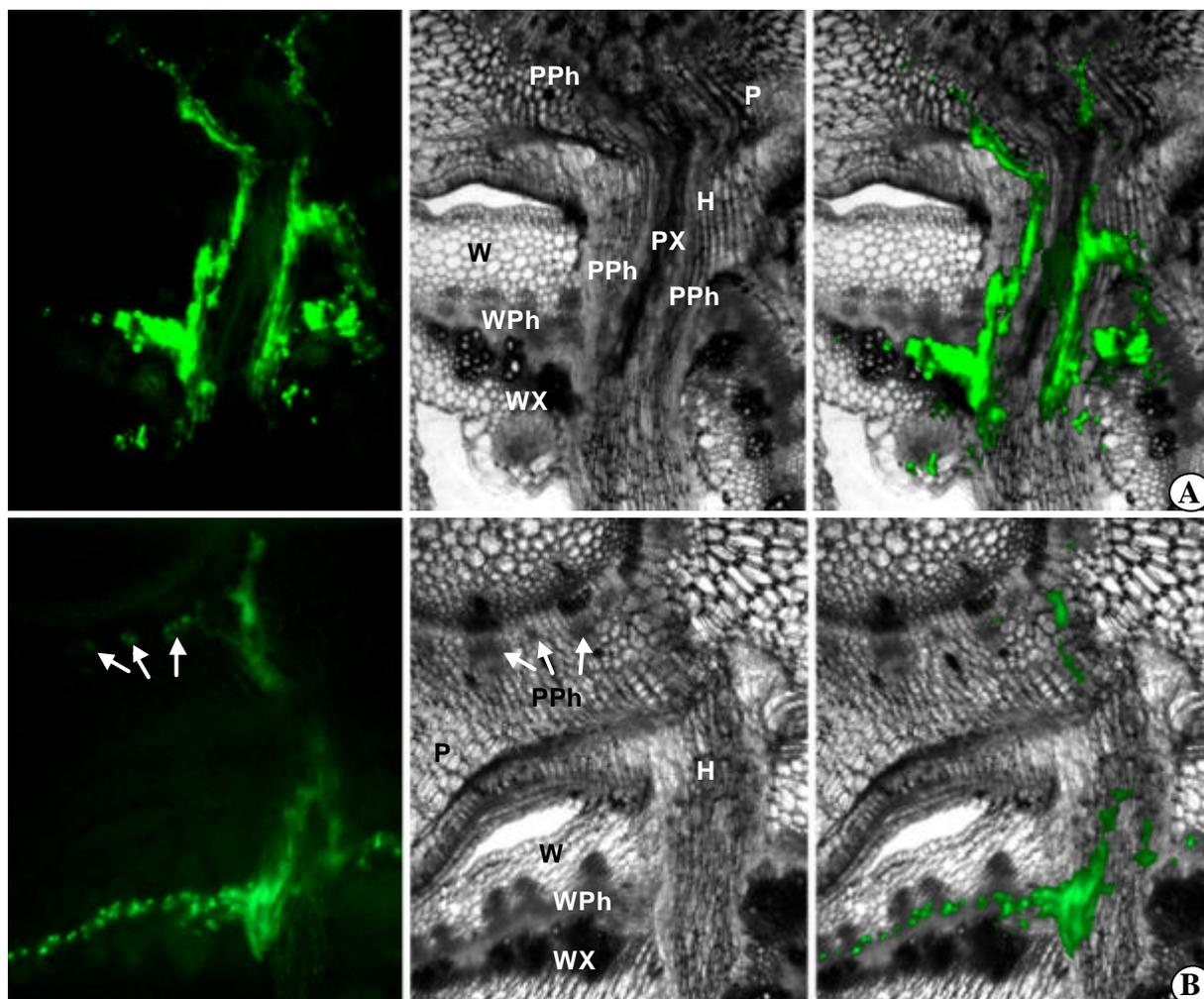


Abb. 3-14: *Vicia faba-Cuscuta reflexa*

Transport der Fluoreszenzfarbstoffe Carboxyfluorescein (A) und HPTS (B) im Wirt-Parasit-System. Fluoreszenz- und Transmissionaufnahmen von Querschnitten durch die Haustorialregion. Die Farbstoffe wurden als Ester an *source*-Blätter der Wirtspflanze appliziert.

P=Parasiten-Achse=*Cuscuta reflexa* (quer), H=Haustorialkeil (längs), W=Wirts-Achse=*Vicia faba* (quer), WX=Wirts-Xylem, WPh=Wirts-Phloem, PX=Parasiten-Xylem, PPh=Parasiten-Phloem

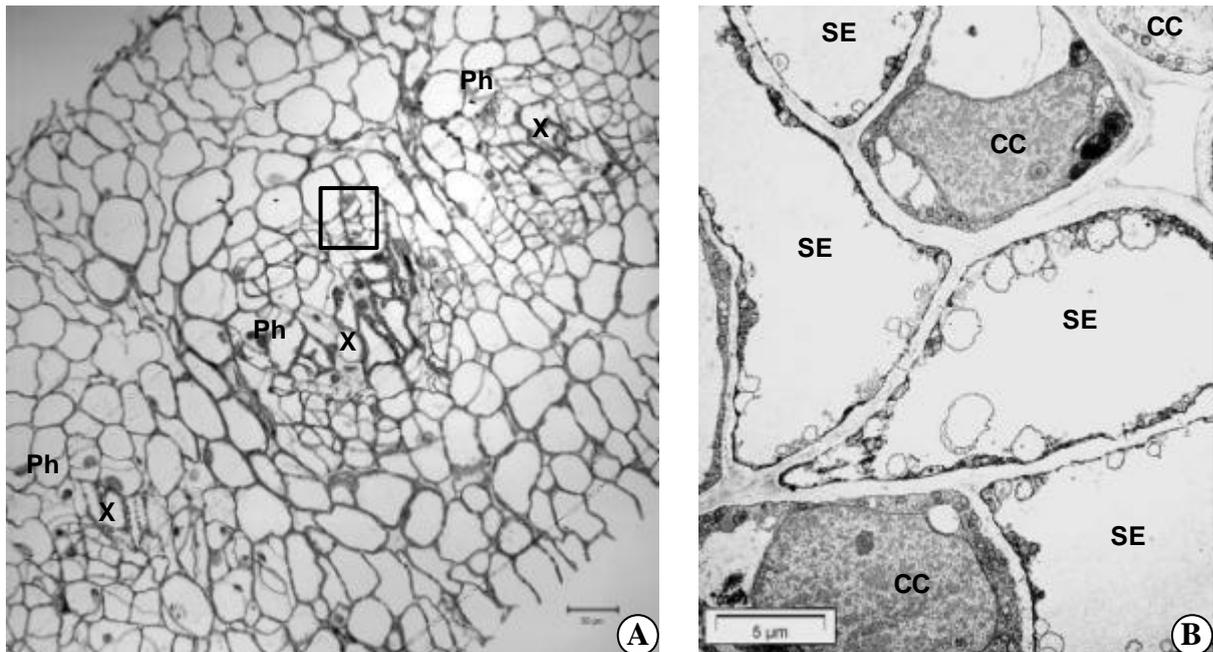


Abb. 3-15: *Cuscuta reflexa*

#### Querschnitt durch das elliptische Haustorium

- (A) Leitbündel mit großlumigen zentralen Xylemelementen, umgeben von zahlreichen Phloemelementen  
 (B) Ausschnitt aus (A); elektronenmikroskopische Aufnahme der Siebelement-Geleitzellen Komplexe

X=Xylemelemente, Ph=Phloemelemente, SE=sieve element (Siebelement), CC=companion cell (Geleitzelle)

### 3.1.3.3 Translokation von Proteinen

#### 3.1.3.3.1 Etablierung des Wirt-Parasit-Systems *Arabidopsis thaliana*-*Cuscuta spec.*

Die bisherigen Untersuchungen zum Phloemtransport biotischer (Saccharose) und xenobiotischer (MCPA, Glyphosat, Fluoreszenzfarbstoffe) Substanzen zeigten, dass zwischen Wirt und Parasit eine symplastische Verbindung besteht. Um dieses Ergebnis zu festigen und eine eventuelle Ausschlussgröße der existierenden plasmatischen Verbindungen zu ermitteln, erfolgten Untersuchungen zum Proteintransfer.

Dazu musste zunächst geprüft werden, ob *Arabidopsis thaliana* einen kompatiblen Wirt für *Cuscuta* darstellt, da von *A. thaliana* transgene Pflanzen zur Verfügung standen, die GFP und ein mit Ubiquitin gekoppeltes GFP im Phloem transportieren.

Als Parasitierungsort kommt bei *A. thaliana*-Pflanzen nur die Blütenstandsachse in Frage. Sie enthält 8-12 offene kollaterale Leitbündel. Über sie erfolgt die Versorgung der sich entwickelnden Blüten und Samen mit den in den Rosettenblättern synthetisierten Assimilaten.

Wie bei den anderen Wirt-Parasit-Systemen wurde der kontaktreizbare Abschnitt des Parasiten mit einem inerten Klebeband an der Blütenstandsachse fixiert.

Während für die relativ dicken Achsen von *Cuscuta reflexa* eine Parasitierung im natürlichen gewundenen und im erzwungenen parallelen Induktionsmodus möglich war (Abb. 3-16),

gelang für die wesentlich dünneren Achsen von *Cuscuta odorata* (Abb. 3-17) und *Cuscuta platyloba* (Abb. 3-18D und E) nur eine Parasitierung im gewundenen Modus.

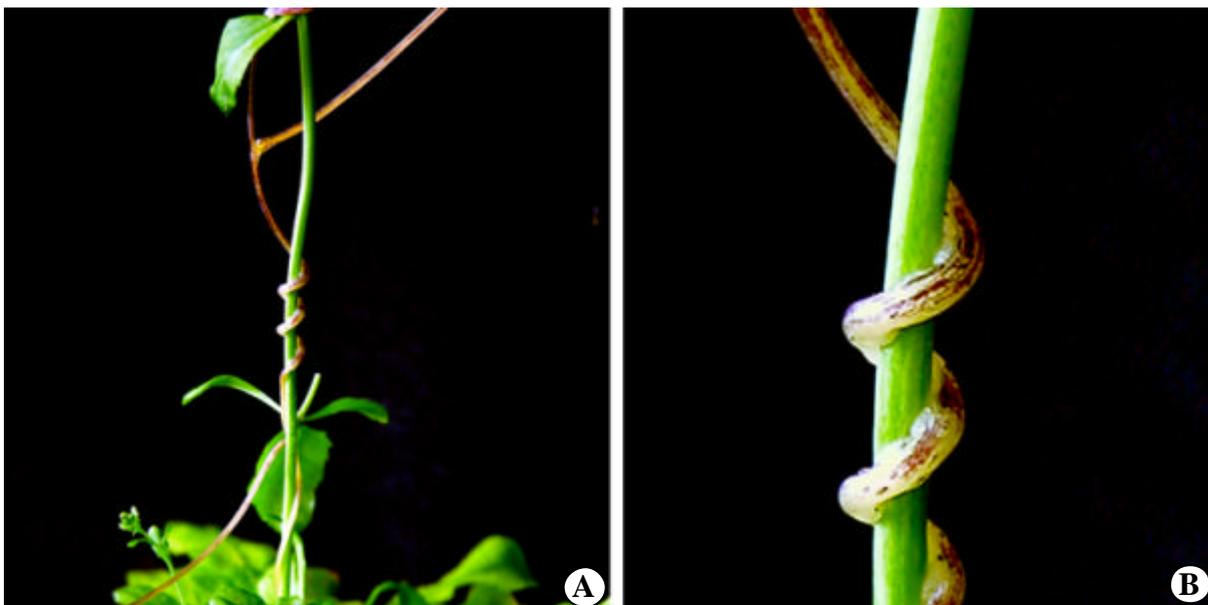
Die nach 10-12 Tagen bei *Cuscuta reflexa*, bei *Cuscuta odorata* bereits nach 5-7 Tagen beobachtete deutliche Zunahme des Wachstums deutete auf die Ausbildung eines kompatiblen Kontaktes hin. Alle *Cuscuta*-Arten zeigen auf *Arabidopsis thaliana* als Wirtspflanze einen kontinuierlichen, wenn auch nicht so stark ausgeprägten Längenzuwachs wie auf den anderen von uns benutzten Wirtspflanzen (*Vicia faba*, *Nicotiana tabacum*, *Pelargonium zonale*). Die Ausgangslänge der *Cuscuta reflexa*-Achsen von 21 cm verdoppelte sich bei Parasitierung auf *Arabidopsis thaliana* innerhalb von 14 Tagen auf durchschnittlich 44,3 cm. Auf *Vicia faba* als Wirtspflanze erreichten die Achsen im gleichen Zeitraum eine Länge von durchschnittlich 60 cm.

Die allgemein beim Längenzuwachs beobachtete Zonierung der *Cuscuta*-Achsen konnte auch bei der Parasitierung von *Arabidopsis* als Wirtspflanze beobachtet werden. Das größte und andauernde Wachstum zeigt der 0-1 cm hinter der Spitze befindlich apikale Bereich. Er hatte mit 81,5 % den Hauptanteil am Gesamtwuchs im betrachteten Versuchszeitraum von 14 Tagen. Der fixierte Abschnitt 2 (1-2,5 cm hinter der Spitze) ist dagegen nur noch mit 10,5 % am Zuwachs der Achsen beteiligt. Die restliche Achse, 2,5-21 cm von der Spitze entfernt, hatte lediglich einen Anteil von 8,0 % am Gesamtwuchs.



**Abb. 3-16: Wirt-Parasit-System *Arabidopsis thaliana*-*Cuscuta reflexa***

- (A) Parasitierung der Blütenstandsachse im gewundenen Induktionsmodus
- (B) Parasitierung der Blütenstandsachse im parallelen Induktionsmodus



**Abb. 3-17: Wirt-Parasit-System *Arabidopsis thaliana*-*Cuscuta odorata***

- (A) Parasitierung der Blütenstandsachse im gewundenen Induktionsmodus  
 (B) Vergrößerung der parasitierten Region der Blütenstandsachse

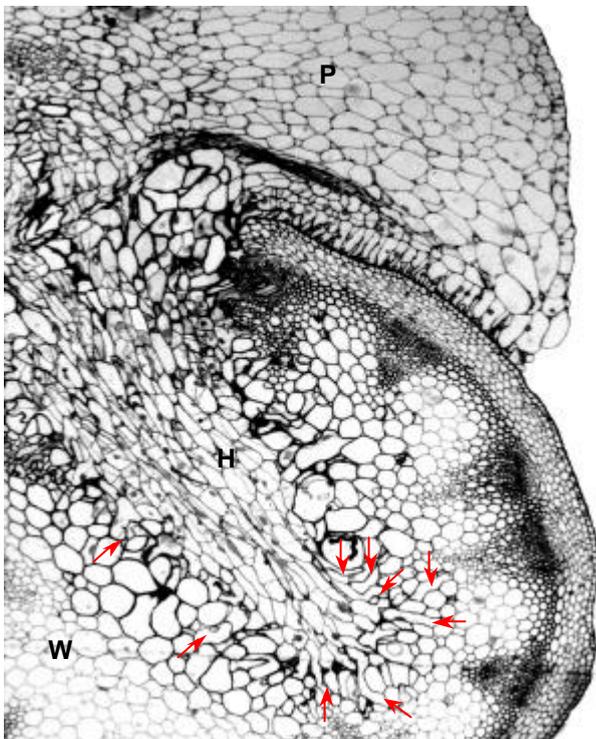
Makroskopisch konnte bei allen *Cuscuta*-Arten die Ausbildung von sog. „Saugfüßchen“ beobachtet werden, mit denen der Parasit einen engen, zunächst nur äußeren Kontakt zum Wirt herstellt (Abb. 3-18). Sie sind die Orte, an denen *Cuscuta* mit den Haustorialkeilen in den Wirt eindringt.



**Abb. 3-18: Sprossbürtige Haustorien an Blütenstandsachsen von *Arabidopsis thaliana***

- (A-C) *Cuscuta reflexa* im parallelen Induktionsmodus  
 (D, E) *Cuscuta platyloba* im gewundenen Modus

Mikroskopisch ist der ins Parenchym von *Arabidopsis* wachsende Haustorialkeil mit den inter- bzw. intrazellulär wachsenden Suchhyphen sichtbar (Abb. 3-19). Aufgrund des geringen Durchmessers der Blütenstandsachsen wuchs er in einigen Fällen durch die Achse durch, so dass das Haustorium Kontakt mit den der Penetrationseite gegenüberliegenden Leitbündeln herstellte (siehe auch Abb. 3-27).



**Abb. 3-19: Querschnitt durch die Haustorialregion des Wirt-Parasit-Systems *Arabidopsis thaliana*-*Cuscuta reflexa***

P= *Cuscuta reflexa*-Achse (quer),  
 H= Haustorialkeil von *Cuscuta reflexa* mit Suchhyphen (längs)  
 W= Infloreszenzachse von *Arabidopsis thaliana* (quer)

Der Übersicht wegen sind nur einzelne Suchhyphen durch Pfeile gekennzeichnet.

Die Funktionalität der Leitbündelkontakte wurde durch Fütterung von DCMU und Saccharose an die Wirtspflanze geprüft. Die Applikation des xylemmobilen DCMU erfolgte über die untere Schnittfläche isolierter Blütenstandsachsen, die der Saccharose durch Auftropfen auf 2-4 Rosettenblätter. Nicht gefütterte Blätter wurden 24 Stunden vor Versuchsbeginn entfernt. Tab. 3-12 zeigt die Verteilungsmuster beider Substanzen.

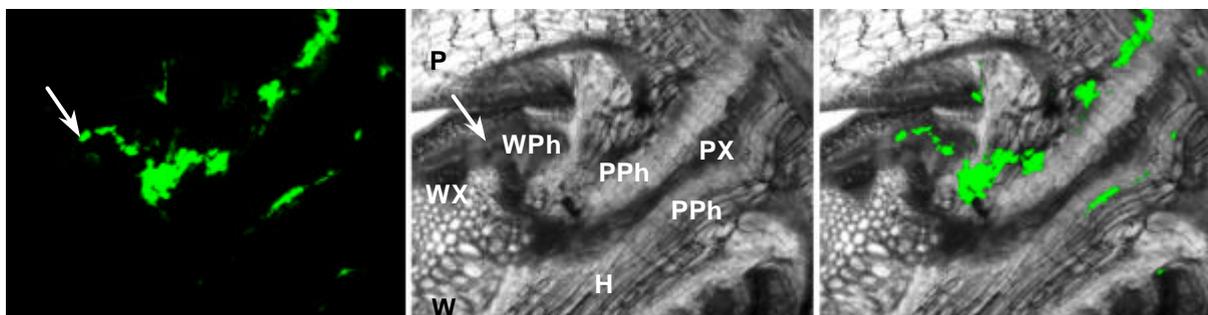
Wie in allen anderen Wirt-Parasit-Systemen ist der Transport über den Xylemanschluss wegen der eingeschränkten Transpiration des Parasiten nur sehr gering. Lediglich  $9,4 \pm 1,2$  % des transportierten DCMU gelangen in die *Cuscuta*,  $84,0 \pm 2,7$  % verbleiben in der Blütenstandsachse von *Arabidopsis*. Wesentlich effektiver dagegen ist der Transfer von Substanzen über das Phloem,  $70,8 \pm 5,3$  % der transportierten Saccharose gelangen in den Parasiten. *Cuscuta* ist auch in diesem Wirt-Parasit-System dominierender *sink*.

**Tab. 3-12: Wirt-Parasit-System *Arabidopsis thaliana* WT-*Cuscuta reflexa*. Verteilungsmuster von  $^{14}\text{C}$ -DCMU und  $^{14}\text{C}$ -Saccharose nach 24-stündiger Applikation.**

Abschnitt	prozentualer Anteil an transportierten radioaktiv markierten Verbindungen	
	DCMU	Saccharose
<b>Blattwirtel</b>	6,6 ± 2,0	
<b><i>A. thaliana</i>-Infloreszenzachse</b>	84,0 ± 2,7	29,2 ± 5,3
<b><i>Cuscuta</i> gesamt</b>	<b>9,4 ± 1,2</b>	<b>70,8 ± 5,3</b>
davon:		
<b>Haustorialstück</b>	97,3 ± 0,9	50,3 ± 10,4
<b>Achse</b>	2,7 ± 0,9	49,7 ± 10,4

Die Applikation von  $^{14}\text{C}$ -DCMU erfolgte über die Schnittfläche isolierter Blütenstandsachsen, die Applikation von  $^{14}\text{C}$ -Saccharose durch Auftropfen auf 2-4 Rosettenblätter. Zur Berechnung der Verteilungsmuster wurde die Summe der Radioaktivität außerhalb der Fütterungsstelle=100% gesetzt und der Gehalt der einzelnen Abschnitte auf diesen Wert bezogen. n=4 (DCMU), n=8 (Saccharose); mean ± SE

Nach Applikation des Esters von Carboxyfluorescein an die Rosettenblätter des Wirtes ausgewertete Fluoreszenzbilder zeigen, dass ebenso wie im Wirt-Parasit-System *Vicia faba*-*Cuscuta reflexa* auch in diesem Wirt-Parasit-System (*A. thaliana*-*C. reflexa*) zwischen dem Phloem des Wirtes und dem Phloem des Parasiten über das Haustorium eine symplastische Verbindung besteht (Abb. 3-20). In den Handschnitten durch die Haustorialregion ist eine ausschließlich auf die Leitgewebe von Wirt und Parasit beschränkte Markierung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Carboxyfluorescein (CF) erkennbar. Das Phloem des *Arabidopsis*-Leitbündels ist durch CF markiert und erscheint im Fluoreszenzbild grün (Abb. 3-20 Pfeil). Über die Absorptionshyphe, die einen Kontakt zum Wirtsploem hergestellt hat, tritt der Farbstoff in das Haustorium der *Cuscuta* über. Die Phloemelemente, die das im Haustorialkeil zentral befindliche Xylem (im Transmissionsbild dunkel) umgeben, zeigen ebenfalls eine CF-Fluoreszenz.



**Abb. 3-20: *Arabidopsis thaliana*-*Cuscuta reflexa***

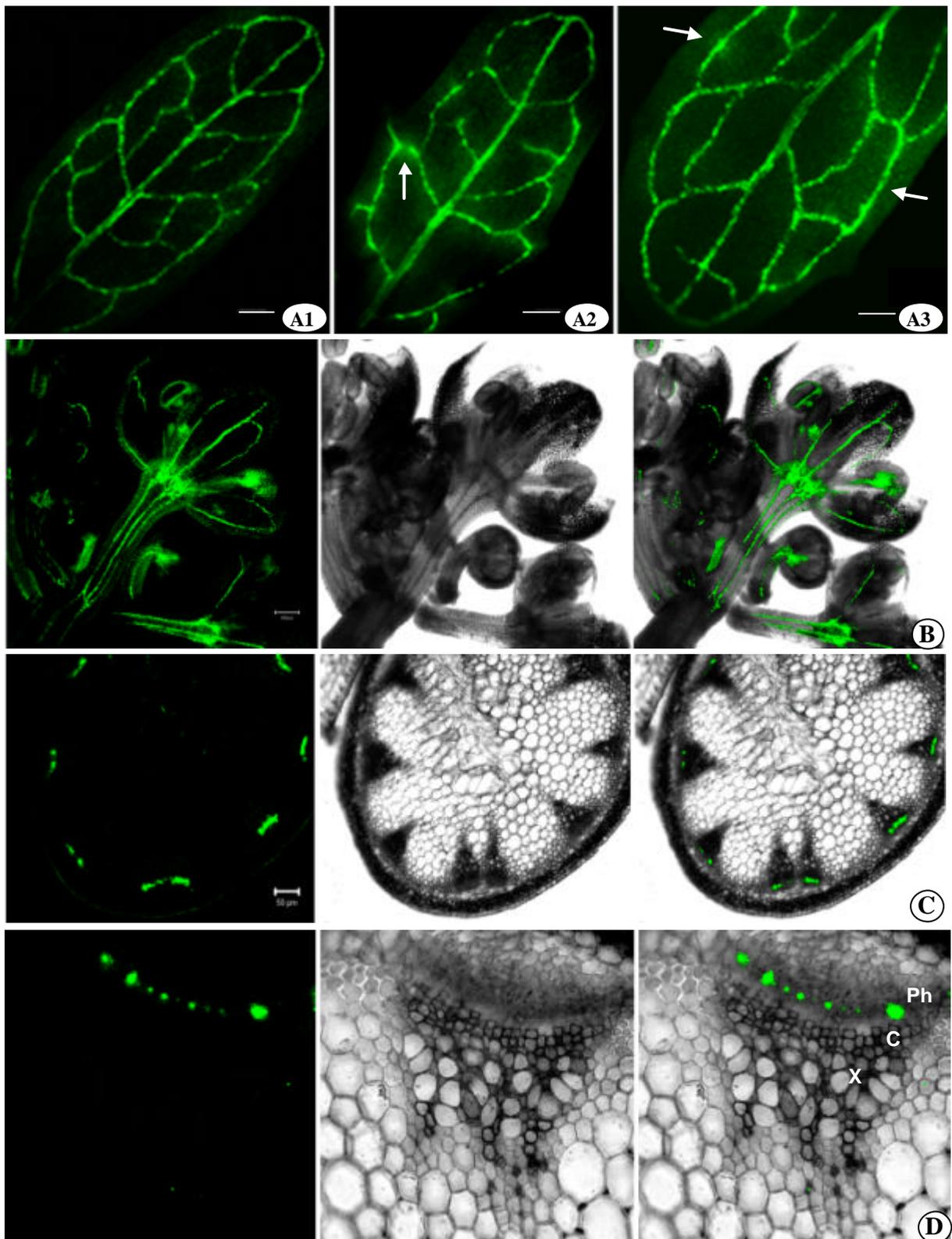
**Transport des Fluoreszenzfarbstoffes Carboxyfluorescein im Wirt-Parasit-System. Fluoreszenz- und Transmissionsaufnahmen von Querschnitten durch die Haustorialregion. Der Farbstoff wurde als Ester an die Rosettenblätter der Wirtspflanze appliziert.**

P=Parasiten-Achse=*Cuscuta reflexa* (quer), H=Haustorialkeil (längs), W=Wirts-Achse=*Arabidopsis thaliana* (quer), WX=Wirts-Xylem, WPh=Wirts-Phloem, PX=Parasiten-Xylem, PPh=Parasiten-Phloem

### 3.1.3.3.2 Transport von GFP

In den transgenen Pflanzen von *Arabidopsis thaliana* werden das aus der pazifischen Qualle *Aequorea victoria* isolierte grün fluoreszierende Protein (GFP) bzw. GFP-Ubiquitin unter der Kontrolle des AtSUC2-Promotors in den Geleitzellen exprimiert. Über Plasmodesmen gelangen die Proteine in die benachbarten Siebröhrenglieder und werden in diesen gemeinsam mit den Assimilaten in Richtung der *sinks* transportiert. Nach Anregung durch Licht entsprechender Wellenlänge geben die Proteine ein Fluoreszenzlicht ab. Dadurch ist es möglich, ihre Lokalisation in der Pflanze nachzuweisen und ihren Transportweg mikroskopisch zu verfolgen. Abb. 3-21 zeigt mit dem konfokalen *laser scanning* Mikroskop ausgewertete Bilder von Rosettenblättern, Blüten und Querschnitten durch die Blütenstandsachse von GFP-*Arabidopsis*-Pflanzen (27 kDa). In den älteren Rosettenblättern (Abb. 3-21A1), die als *source* fungieren, ist die Fluoreszenz nur auf die Blattadern beschränkt, in *sink*-Blättern ist daneben auch eine schwache diffuse Fluoreszenz im Mesophyll als Zeichen für eine Entladung zu sehen (Abb. 3-21A2 und A3 Pfeile). Auch die Blüte als *sink* weist durch das zusammen mit den Assimilaten transportierte GFP eine deutliche Fluoreszenz auf (Abb. 3-21B).

Querschnitte durch die Blütenstandsachse zeigen, dass die Fluoreszenz auf die kollateralen Leitbündel und hier ausschließlich auf das Phloem (Abb. 3-21C und D) beschränkt ist.



**Abb. 3-21: Charakterisierung der GFP-Pflanzen von *Arabidopsis thaliana***

- (A1) GFP-Fluoreszenz in den Blattnerven der source-Blätter
- (A2+3) GFP-Fluoreszenz sowohl in den Blattnerven als auch diffus im Mesophyll (Pfeile) der sink-Blätter
- (B) GFP-Fluoreszenz in den Leitbündeln der Blüte
- (C) GFP markierte Leitbündel der Infloreszenzachse (Querschnitt)
- (D) Vergrößerung eines Leitbündels; Fluoreszenz ausschließlich im Phloem

Ph=Phloem, C=Cambium, X=Xylem; A-B: bar=100µm; C: bar=50µm

Wir parasitierten diese Pflanzen mit *Cuscuta reflexa*, *Cuscuta odorata* und *Cuscuta platyloba*. Alle *Cuscuta*-Arten entwickelten sich an den Infloreszenzachsen der transgenen Pflanzen in gleicher Weise wie auf Pflanzen des *Arabidopsis*-Wildtyps. Nach einer Parasitierungsdauer von mindestens 14 und höchstens 30 Tagen wurden Handschnitte durch die Haustorialregion angefertigt und diese mittels konfokaler *laser scanning* Mikroskopie ausgewertet. Für alle Wirt-Parasit-Systeme wurden übereinstimmende Bilder erhalten (Abb. 3-22 und 3-23).

Durch den verstärkten Assimilat- und damit auch GFP-Transport in Richtung des *sinks* *Cuscuta* ist in den Leitbündel an der Kontaktstelle zwischen Wirt und Parasit eine verstärkte Fluoreszenz gegenüber den anderen, nicht parasitierten Leitbündeln sichtbar (Abb. 3-23A-C). Bei allen drei verwendeten *Cuscuta*-Arten erfolgt ein Übertritt des GFP aus dem Wirt in den Parasiten. Die GFP-Fluoreszenz ist sowohl in den Phloemelementen des längs geschnittenen Haustoriums als auch in den quer geschnittenen Leitbündeln der *Cuscuta*-Achse sichtbar (Abb. 3-23A-C). Die in Abb. 3-23D dargestellte Vergrößerung zeigt deutlich, dass die GFP-Fluoreszenz innerhalb des Haustorialbereiches ausschließlich auf das Phloem beschränkt ist.

Auch innerhalb der Achse von *Cuscuta* ist nur das Phloem markiert (Abb. 3-22A), über das der Transport des GFP zu den *sinks*, z.B. den Seitenknospen erfolgt (Abb. 3-22B).

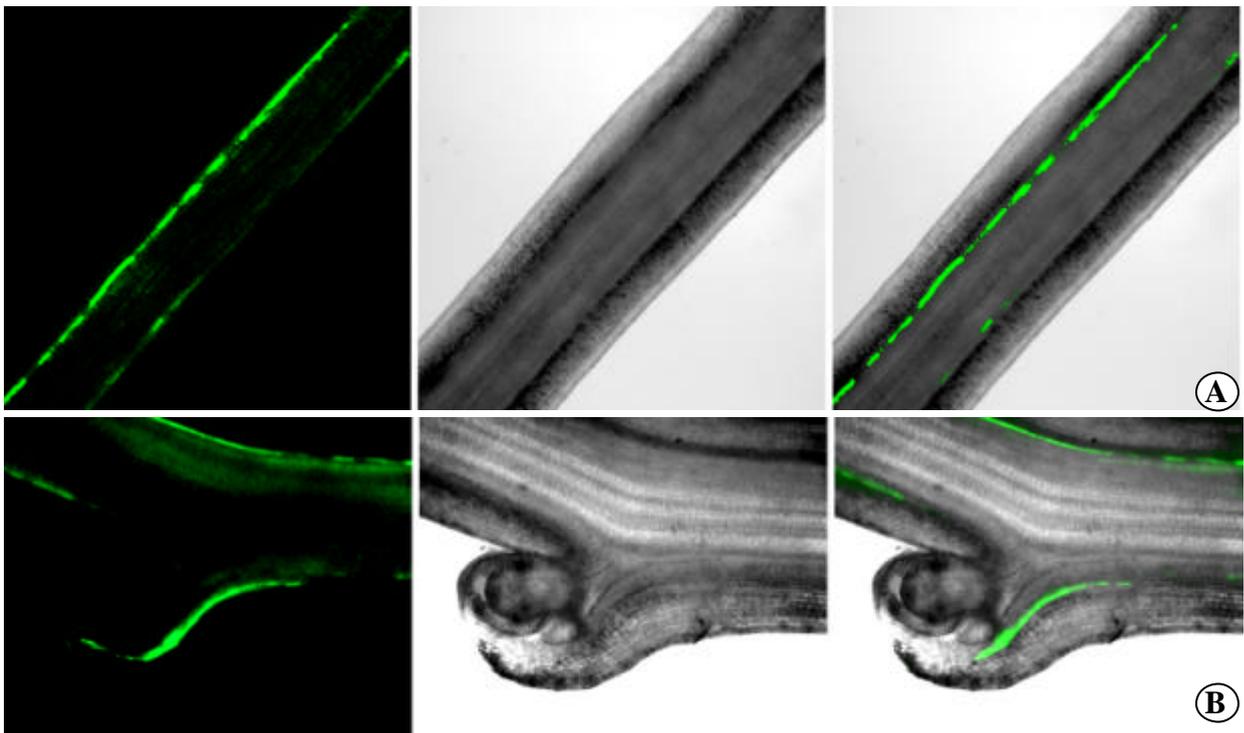
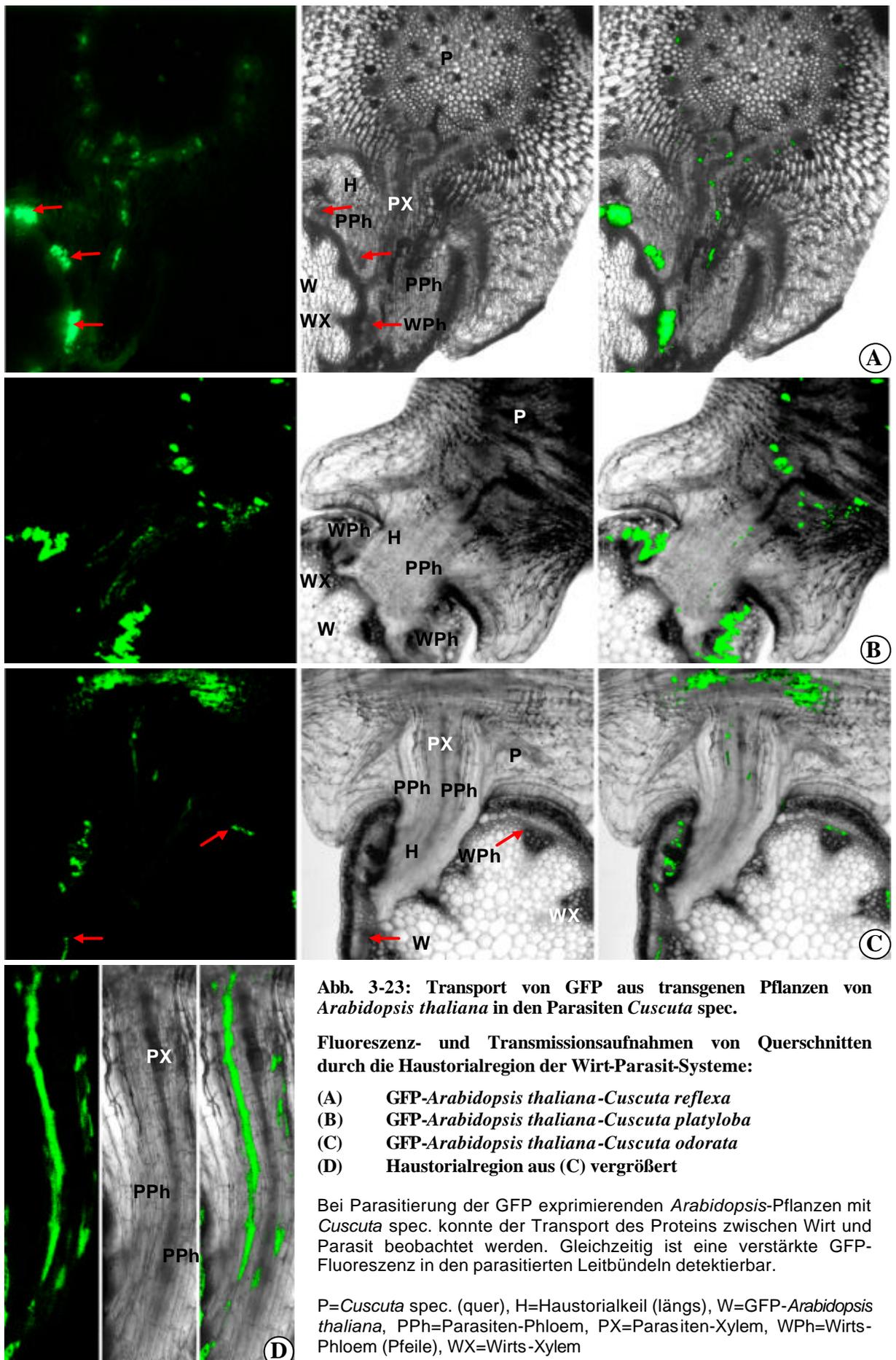


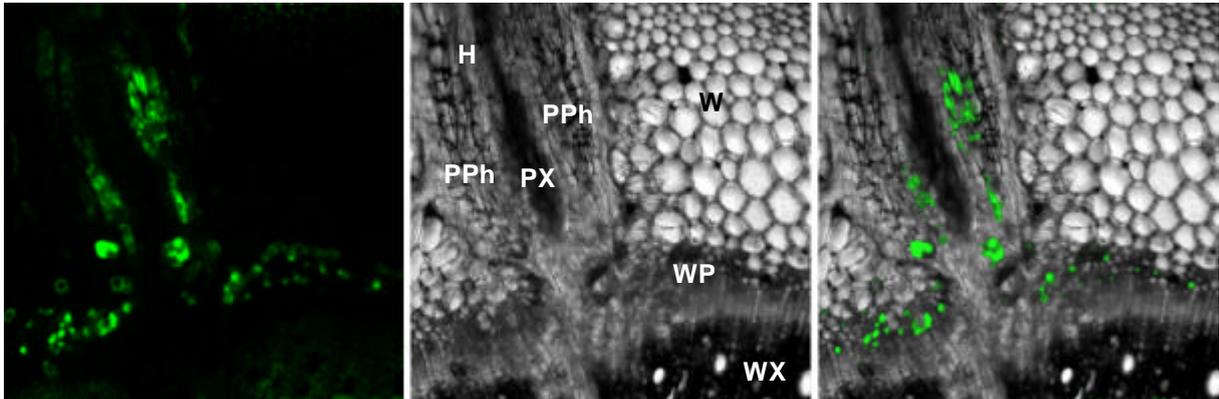
Abb. 3-22: GFP-Lokalisation in *Cuscuta*

Längsschnitte durch die Achsen von *Cuscuta odorata* (A) und *Cuscuta reflexa* (B) zeigen einen Transport von GFP im Phloem und zu den *sinks*, z.B. Seitenknospe (B).



*Cuscuta reflexa* wurde außerdem auf einer weiteren GFP exprimierenden Wirtspflanze, *Nicotiana tabacum* cv. Sumsai, kultiviert. Auch für dieses Wirt-Parasit-System konnte bei mikroskopischer Betrachtung der Haustorialregion der Transport des grünfluoreszierenden Proteins aus dem Wirt in den Parasiten nachgewiesen werden (Abb. 3-24).

Die GFP-Fluoreszenz ist auch hier ausschließlich auf das Phloem beschränkt. Die verstärkte Fluoreszenz in den durch *Cuscuta* parasitierten Leitbündeln war ebenfalls detektierbar.



**Abb. 3-24: Querschnitt durch die Haustorialregion von *Nicotiana tabacum* cv. Sumsai-*Cuscuta reflexa***

**Transport des GFP in *Cuscuta* bei Parasitierung GFP exprimierender *Nicotiana*-Pflanzen. Auch in diesem Wirt-Parasit-System tritt das GFP ausschließlich im Phloem beider Partner auf.**

H=Haustorialkeil von *Cuscuta* (längs), W=GFP-*Nicotiana tabacum*, PPh=Parasiten-Phloem, PX=Parasiten-Xylem, WPh=Wirts-Phloem, WX=Wirts-Xylem

Die Ergebnisse der GFP-Experimente sind neben der Translokation des symplastischen Markers CF ein weiterer Beweis für die Existenz einer symplastischen Verbindung zwischen Wirt und Parasit.

Um zu prüfen, ob die plasmatischen Verbindungen eine bestimmte Ausschlussgröße besitzen, wurden in einer weiteren Versuchsreihe Blütenstandsachsen von transgenen GFP-Ubiquitin *Arabidopsis*-Pflanzen mit Achsen von *C. reflexa*, *C. odorata* und *C. platyloba* parasitiert. Auch an diesen Pflanzen zeigten alle Parasiten eine „normale Entwicklung“. Nach einer Parasitierungsdauer von mindestens 14 Tagen wurden Handschnitte durch die Haustorialregion angefertigt. Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung der Bilder ergab wieder für alle drei Arten übereinstimmende Ergebnisse. Wie in den GFP-Pflanzen konnte in den parasitierten Leitbündeln eine verstärkte Fluoreszenz durch die Akkumulation des fluoreszierenden Proteins detektiert werden. Jedoch konnte in keiner der mehr als 400 aufgearbeiteten Pflanzen eine Fluoreszenzmarkierung im Haustorium des Parasiten und in dessen Leitbündeln in der Achse festgestellt werden. Auch eine Verlängerung der Parasitierungsdauer auf maximal 30 Tage führte zu keinem positiven Ergebnis (Abb. 3-25).

Das um das 8,5 kDa große Ubiquitin vergrößerte GFP kann offensichtlich die plasmatischen Verbindungen zwischen Wirt und Parasit nicht passieren.

Dass zwischen den GFP-Ubiquitin-Pflanzen (35,5 kDa) und *Cuscuta* spec. jedoch ein funktioneller Phloemkontakt ausgebildet wird, konnte durch Applikation von  $^{14}\text{C}$ -Saccharose

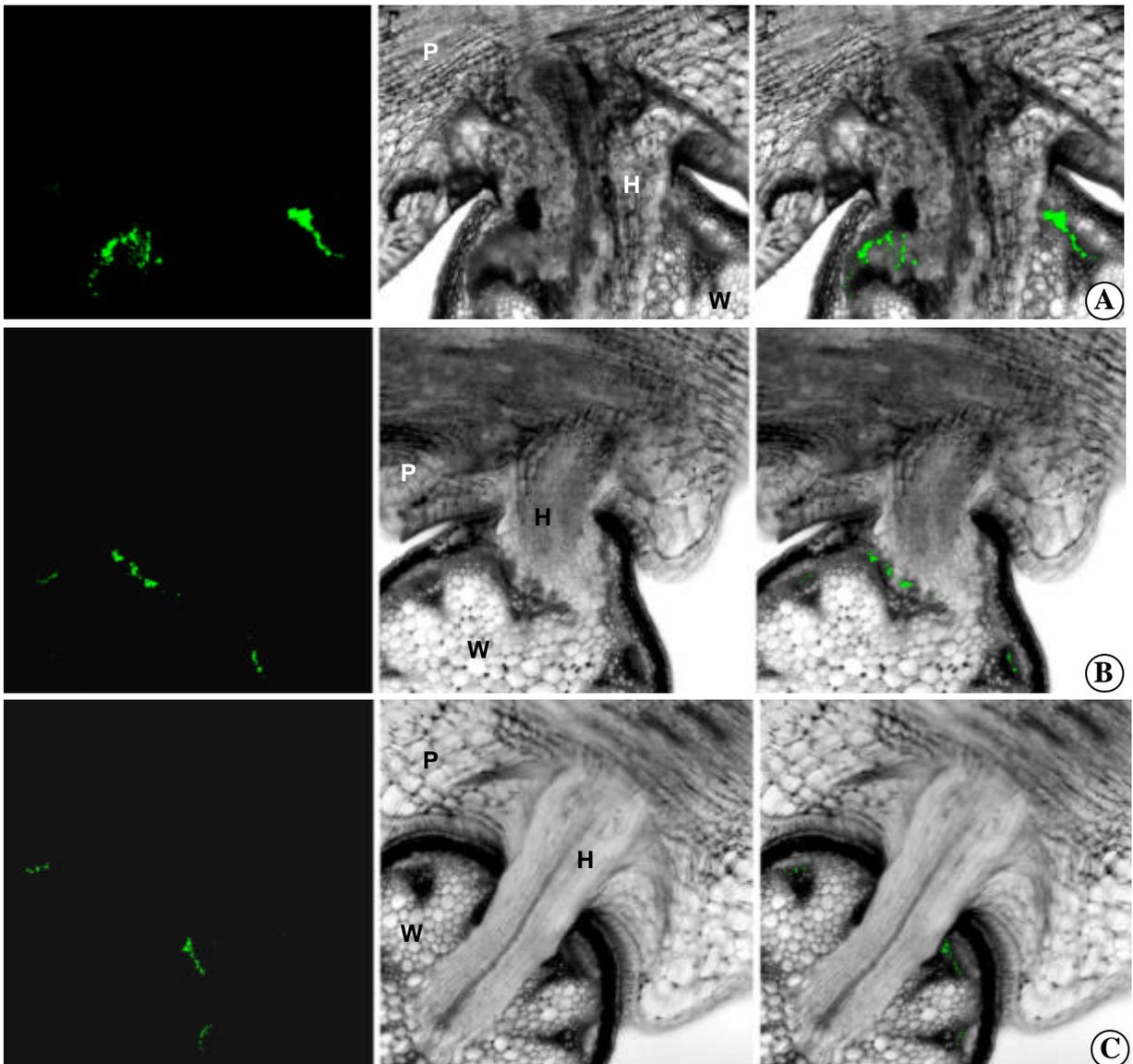
an die Rosettenblätter gezeigt werden. Die aus den Rosettenblättern austransportierte Saccharose gelangt zu  $49,4 \pm 10,5$  % in den Parasiten. In etwa gleicher Größenordnung erfolgt auch ein Saccharosetransport in Wirt-Parasit-Systemen mit Wildtyp- bzw. GFP-Pflanzen in den Parasiten (Tab. 3-13).

**Tab. 3-13: Verteilungsmuster von  $^{14}\text{C}$ -Saccharose in Wirt-Parasit-Systemen aus Wildtyp- und transgenen Pflanzen von *Arabidopsis thaliana* parasitiert mit *Cuscuta reflexa*. Versuchsdauer: 24 Stunden.**

Abschnitt	prozentualer Anteil an transportierter $^{14}\text{C}$ -Saccharose in Wirt-Parasit-Systemen mit		
	Wildtyp- <i>A. thaliana</i>	GFP- <i>A. thaliana</i>	GFP-Ubiquitin <i>A. thaliana</i>
<i>A. thaliana</i> uh Haustorium	15,2 ± 4,3	12,6 ± 0,7	23,5 ± 6,7
<i>A. thaliana</i> mit Haustorium	9,2 ± 2,1	5,7 ± 2,3	10,4 ± 3,1
<i>A. thaliana</i> oh Haustorium	4,8 ± 1,3	24,5 ± 10,3	16,7 ± 4,8
<b><i>Cuscuta</i> gesamt</b>	<b>70,8 ± 5,3</b>	<b>57,2 ± 8,7</b>	<b>49,4 ± 10,5</b>
davon:			
<b>Haustorialstück</b>	50,3 ± 10,4	31,2 ± 8,4	33,8 ± 4,5
<b>Achse</b>	49,7 ± 10,4	68,8 ± 8,4	66,2 ± 4,5

Die Applikation von  $^{14}\text{C}$ -Saccharose erfolgte durch Auftropfen auf 2-4 Rosettenblätter. Zur Berechnung der Verteilungsmuster wurde die Summe der Radioaktivität außerhalb der Fütterungsstelle =100% gesetzt und der Gehalt der einzelnen Abschnitte auf diesen Wert bezogen.

uh=unterhalb, oh=oberhalb, n=8 (WT-A.th.), n=2 (GFP-A.th.), n=3 (GFP-Ubiquitin A.th.); mean ± SE



**Abb. 3-25: Querschnitte durch die Haustorialregion der Wirt-Parasit-Systeme:**

- (A) GFP-Ubiquitin-*Arabidopsis thaliana*-*Cuscuta reflexa*
- (B) GFP-Ubiquitin-*Arabidopsis thaliana*-*Cuscuta platyloba*
- (C) GFP-Ubiquitin-*Arabidopsis thaliana*-*Cuscuta odorata*

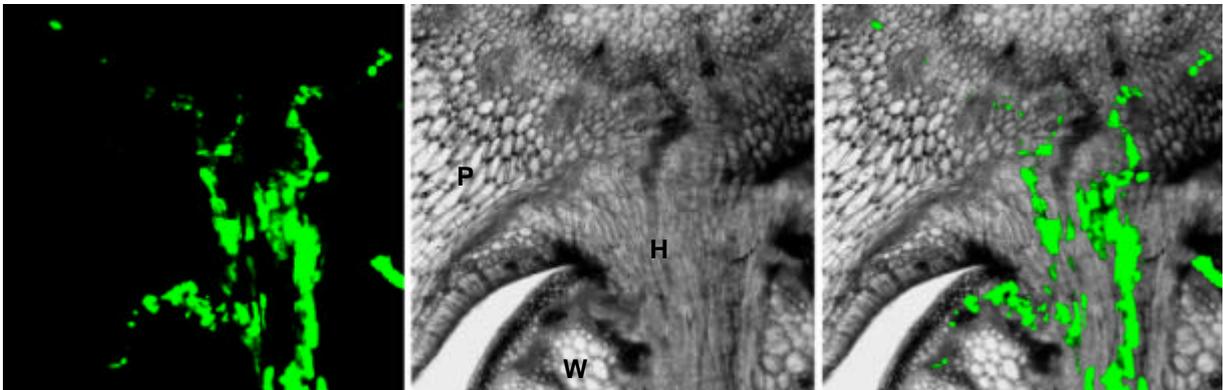
Bei Parasitierung von GFP-Ubiquitin exprimierenden *Arabidopsis*-Pflanzen mit *Cuscuta spec.* konnte kein Übertritt des Proteins an der Kontaktstelle zwischen Wirt und Parasit beobachtet werden. Es kommt lediglich zum verstärkten Transport und somit verstärkter GFP-Fluoreszenz in den durch *Cuscuta* befallenen Leitbündeln im Wirt.

P=*Cuscuta spec.* (quer), H=Haustorialkeil (längs), W=GFP-Ubiquitin-*Arabidopsis thaliana* (quer)

Dass auch tatsächlich eine offene symplastische Verbindung zwischen Wirt und Parasit besteht, kann durch den ungehinderten Transport des Fluoreszenzfarbstoffes Carboxyfluorescein nach Blattapplikation des Esters (CFDA) an die Rosettenblätter des Wirtes mikroskopisch dargestellt werden (Abb. 3-26).

Die Fluoreszenz in den kollateralen Leitbündeln der *Arabidopsis*-Infloreszenzachsen stammt in diesen Versuchen von GFP-Ubiquitin und von Carboxyfluorescein. Da das GFP-Ubiquitin, wie in Abb. 3-25 dargestellt, nicht in den Parasiten übertritt, ist die im Haustorialkeil und in

der quer geschnittenen Parasitenachse detektierte Grünfluoreszenz auf den Phloemmarker Carboxyfluorescein zurückzuführen (Abb. 3-26).



**Abb. 3-26: GFP-Ubiquitin-*Arabidopsis thaliana*-*Cuscuta reflexa***

**Transport des Fluoreszenzfarbstoffes Carboxyfluorescein im Wirt-Parasit-System. Fluoreszenz- und Transmissionsaufnahmen vom Querschnitt durch die Haustorialregion. Der Farbstoff wurde als Ester an die Rosettenblätter der Wirtspflanze appliziert.**

Die Fluoreszenz im Phloem der Leitbündel der Wirtspflanze ist auf GFP-Ubiquitin und CF-Fluoreszenz zurückzuführen. Die Fluoreszenz im Haustorium stammt lediglich vom CF, da GFP-Ubiquitin nicht in den Parasiten übertritt.

P=Parasitenachse (quer), H=Haustorium (längs), W=Wirtsachse (quer)

Neben der offenen Verbindung zwischen dem Phloem von *Arabidopsis thaliana* und dem Phloem von *Cuscuta spec.* konnte auch die Verbindung zwischen beiden Xylemen fluoreszenzmikroskopisch durch Applikation des Xylemmarkers Texas red Dextran 3000 dargestellt werden.

In Abb. 3-27 ist die durchgängige Markierung des Xylemweges mit Texas red gezeigt. Da dieser Nachweis an GFP exprimierenden *Arabidopsis*-Pflanzen durchgeführt wurde, ist neben der Rotfluoreszenz von Texas red im Xylem, auch die Grünfluoreszenz von GFP im Phloem der Leitbündel sichtbar.

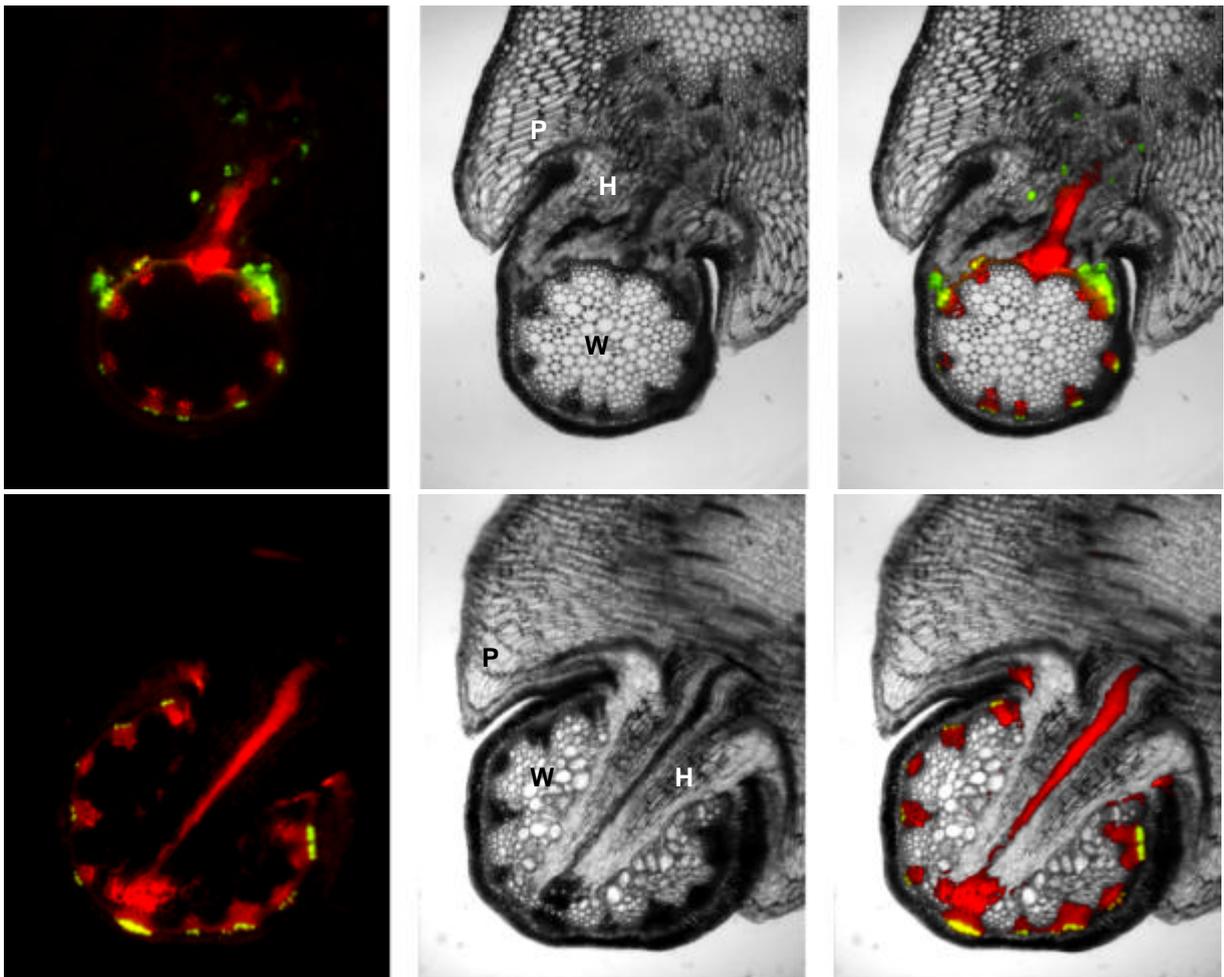


Abb. 3-27: *GFP-Arabidopsis thaliana-Cuscuta reflexa*

Querschnitte durch die Haustorialregion nach Applikation des Xylemmarkers Texas red Dextran 3000 an die Wirtspflanze

Dargestellt ist die Fluoreszenzaufnahme, die Transmissionsaufnahme sowie die Kombination beider. Die Markierung mit Texas red zeigt durchgängige Xylembahnen, über die der Transport zwischen Wirt und Parasit stattfindet. Die Applikation des Xylemfarbstoffs erfolgte an einer transgenen *Arabidopsis*-Pflanze, die GFP exprimiert. Neben der Rotfluoreszenz von Texas red ist daher auch die Grünfluoreszenz von GFP sichtbar.

P=Parasitenachse (quer), H=Haustorium (längs), W=Wirtsachse (quer)

## 3.2 Transport aus dem Parasiten in den Wirt

### 3.2.1 Versuchssysteme

Die bisher vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass zumindest bis zu einer Molekülgröße von 27 kDa ein nichtselektiver Transfer aller im Phloem und Xylem der Wirtspflanze transportierten Substanzen über das Haustorium in die Leitgewebe des Parasiten stattfindet. In beiden Transportsystemen erfolgt der Transfer ohne Membranpassage.

Ziel der folgenden Untersuchungen war es, zu klären, ob und in welchem Umfang auch ein Transport von Substanzen aus dem Parasiten in den Wirt erfolgt.

Dabei wurden zwei Wirtspflanzen über eine *Cuscuta*-Brücke miteinander verbunden. Die Transportsubstanzen wurden entweder an die als Donorpflanze bezeichnete erste Wirtspflanze (Virustransport, Saccharosetransport) oder an die *Cuscuta*-Brücke (CF-Transport) appliziert bzw. in der Donorpflanze (GFP) synthetisiert. Zum Nachweis des Transports aus der Parasitenachse in das Wirtsgewebe wurde der Gehalt der Transportsubstanzen in der zweiten Wirtspflanze (Akzeptorpflanze) bestimmt bzw. im Fall von CF mikroskopisch lokalisiert.

### 3.2.2 Virustransport

PVY (*potato virus Y*) ist der namengebende Vertreter der Potyvirus-Gruppe. Das Virus bildet lange flexible stäbchenförmige Partikel mit einer durchschnittlichen Länge von 730 nm und einer Breite von ca. 11 nm. Sein Genom besteht aus einem einzelsträngigen (+) RNA Molekül von ca. 9700 Nucleotiden. Die Expression erfolgt in Form eines Polyproteins, das durch die Aktivität verschiedener, viruscodierter Proteasen zu den entsprechenden Einzelproteinen prozessiert wird.

Die Stammhaltung des für unsere Untersuchungen benutzten Virus PVY<sup>N</sup> (Virusstamm-N) erfolgte durch mechanische Inokulation auf *Nicotiana tabacum* var. Samsun NN in den Gewächshäusern des IPK Gatersleben.

Wie die Untersuchungen zum Transport von Nicotin und GFP zeigten, stellt Tabak für *Cuscuta reflexa* einen kompatiblen Wirt dar. Für die Virusexperimente haben wir gesunde, bereits mit *Cuscuta* parasitierte Pflanzen an den *source*-Blättern unterhalb der Parasitierungsstelle mechanisch mit virushaltigem Pflanzensaft, der aus der Stammhaltung gewonnen wurde, infiziert. Die *Cuscuta*-Achsen wurden entweder sofort, d.h. am Tag der Inokulation, oder nach 7 Tagen auf eine zweite, gesunde Tabakpflanze (Akzeptorpflanze) übergeleitet (Abb. 3-27).



**Abb. 3-27: Brückensystem des Wirt-Parasit-System *Nicotiana tabacum* SNN-*Cuscuta reflexa***

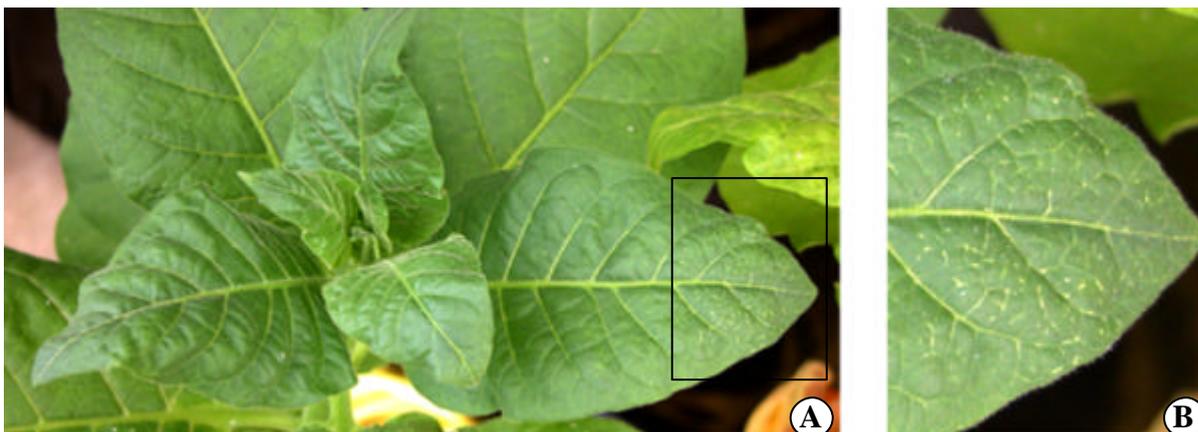
Die Donorpflanze (Nt1, *Nicotiana tabacum* SNN) wurde lokal mit PVY<sup>N</sup> infiziert und über eine *Cuscuta*-Brücke mit einer zweiten, gesunden Tabakpflanze (Akzeptorpflanze, Nt2, *Nicotiana tabacum* SNN) verbunden.

Nach Ablauf der Versuchszeit (11 bzw. 18 Tage nach Parasitierung der 2. Wirtspflanze) wurde das Brückensystem in folgende Abschnitte zerschnitten und diese getrennt aufgearbeitet:

- *sink*-Blätter der mit PVY<sup>N</sup> inokulierten Donorpflanze
- Haustorialstück mit Wirtsgewebe der Donorpflanze
- *Cuscuta*-Brücke
- Haustorialstück ohne Haustorialkeile
- freie *Cuscuta*-Achse
- *sink*-Blätter der Akzeptorpflanze.

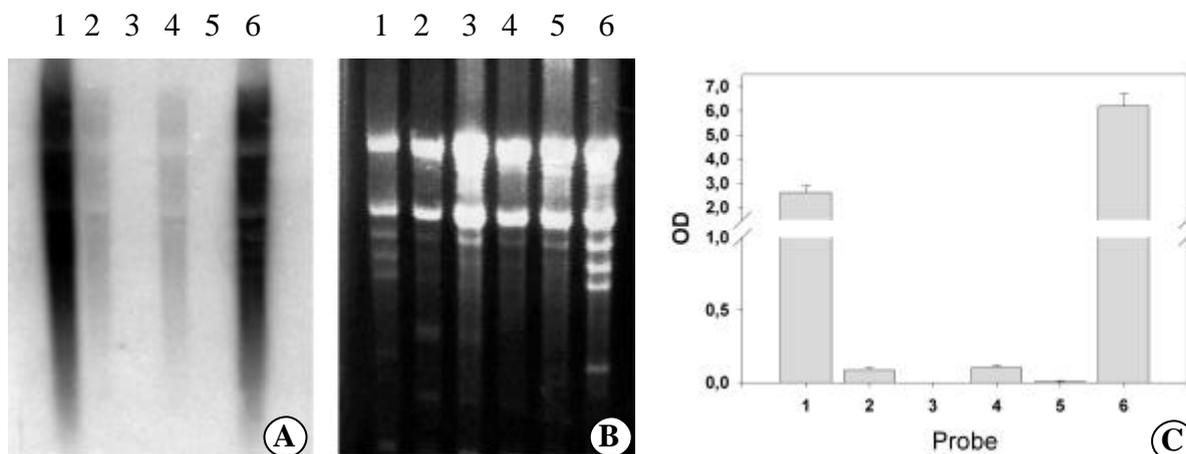
Äußerlich konnten zum Erntezeitpunkt nur bei einigen Akzeptorpflanzen virusinduzierte Symptome in Form von chlorotischen oder nekrotischen Streifen beobachtet werden (Abb. 3-28). Von diesen sichtbar geschädigten Pflanzen erfolgte der Nachweis des Virus sowohl molekularbiologisch durch Northern-Blot-Analyse als auch serologisch durch ELISA.

In beiden Analysen konnte das gleiche Muster der Virusverteilung im Brückensystem erhalten werden. Der Virus war eindeutig in den *sink*-Blättern der Donor- und Akzeptorpflanze, sowie in den Haustorialstücken beider Pflanzen nachweisbar (Abb. 3-29).



**Abb. 3-28: *Nicotiana tabacum*-*Cuscuta reflexa* Brückensystem**

- (A) *sink*-Blätter der Akzeptorpflanze mit virusinduzierten Symptomen  
 (B) Ausschnittsvergrößerung von (A); Die PVY<sup>N</sup>-Symptome des Blattes sind auf einen durch *Cuscuta* vermittelten Virustransport aus der lokal infizierten Donorpflanzen in die Akzeptorpflanze zurückzuführen.



**Abb. 3-29: Molekulare (Northern Blot) und serologische (ELISA) Analyse des PVY-Transports aus einer Donorpflanze über eine *Cuscuta*-Brücke in eine Akzeptorpflanze von *Nicotiana tabacum***

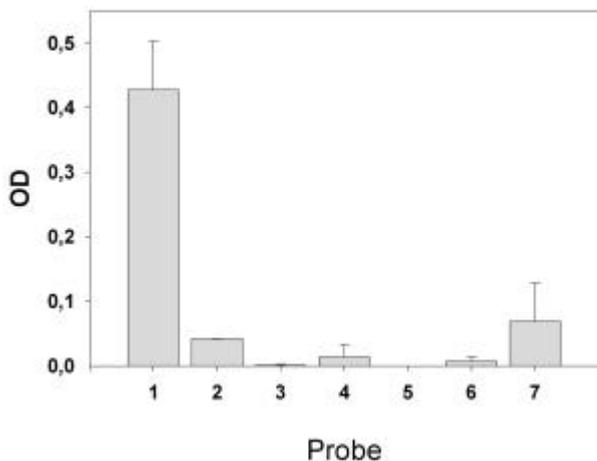
- (A) Northern Blot, 30µg Gesamt-RNA; Hybridisierung mit PVY-capsid protein-cDNA  
 (B) Ladungskontrolle=ribosomale RNA nach Ethidiumbromid-Färbung  
 (C) serologischer Nachweis des PVY<sup>N</sup>-Transports (ELISA). Daten sind absolut signifikant und zeigen Übereinstimmung zur Northern-Analyse (A)

- 1 *sink*-Blätter der mit PVY<sup>N</sup> inokulierten Pflanze
- 2 Haustorialstück mit Wirtsgewebe
- 3 Brücke
- 4 Haustorialstück *Cuscuta* ohne Haustorialkeile
- 5 freie Achse
- 6 *sink*-Blätter der Akzeptorpflanze.

Auch in Systemen, bei denen an den Akzeptorpflanzen keine virusinduzierten Schadbilder optisch lokalisiert werden konnten, erfolgte eine serologische Analyse durch ELISA.

Wie in Abb. 3-30 sichtbar, ist auch in diesen Systemen der PVY<sup>N</sup>-Virus in allen Abschnitten der Akzeptorpflanze und in der freien *Cuscuta*-Achse nachweisbar. Offensichtlich kommt es aber aufgrund des zu geringen Virusgehalts zu keiner Ausprägung sichtbarer Symptome. Obwohl in keinem Testansatz der Virus in der *Cuscuta*-Brücke nachgewiesen werden konnte,

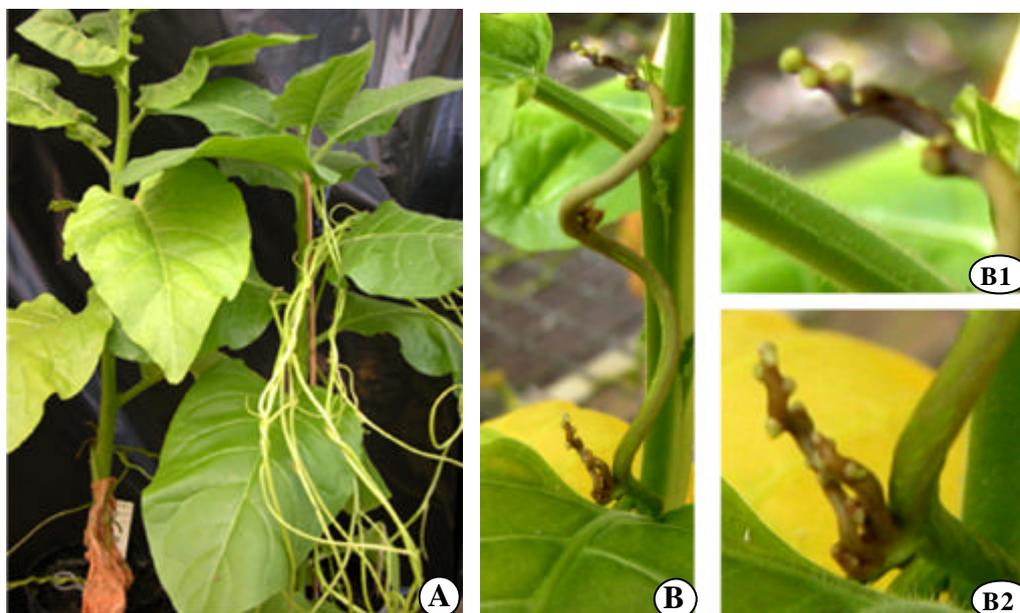
zeigen die Untersuchungen doch eindeutig, dass *Cuscuta* als Virusüberträger zwischen den beiden Tabakpflanzen fungiert.



**Abb. 3-30: Serologischer PVY-Nachweis (ELISA)**

- 1 *sink*-Blätter der PVY inokulierten Pflanze
- 2 Haustorialstück mit Wirtsgewebe
- 3 *Cuscuta*-Brücke
- 4 freie Achse
- 5 *Cuscuta*-Haustorialstück von der Akzeptorpflanze ohne Haustorialkeile
- 6 Tabakstiel der Akzeptorpflanze mit Haustorialkeilen
- 7 *sink*-Blätter Akzeptorpflanze

*Cuscuta* selbst zeigte auf den virusinokulierten Tabakpflanzen ein üppiges Wachstum (Abb. 3-31) und prägte nur in sehr seltenen Fällen PVY<sup>N</sup>-vermittelte Symptome aus (Abb. 3-31B). Diese zeigten sich vor allem in den *sinks*, d.h. den wachsenden Spitzen der Parasitenachse. Das Wachstum dieser geschädigten apikalen Regionen war eingeschränkt, sie wiesen auch eine bräunliche Färbung auf (Abb. 3-31B1 und B2). Es wurden jedoch zahlreiche neue Tochterachsen ausgebildet, die ein ungehindertes üppiges Wachstum zeigten.



**Abb. 3-31: Wachstum des Parasiten *C. reflexa* an virusinfizierten Pflanzen von *N. tabacum*.**

- (A) *Cuscuta* weist ein üppiges Wachstum auf PVY-infizierten Pflanzen auf.
- (B) vereinzelt auftretende virusinduzierte Symptome
- (B1/B2) Ausschnittsvergrößerungen von (B); Wie zu erkennen, sind es vor allem die *sinks*, also die wachsenden Spitzen der Achse, die vom Virus befallen werden. Das Wachstum hier ist eingeschränkt. Dennoch ist durch Bildung mehrerer Tochterachsen eine enorme Vermehrung der Frischmasse, wie sie in (A) dargestellt ist, möglich.

### 3.2.3 Transport von GFP

In dem folgenden Experiment ist der GFP-Transport aus einer GFP exprimierenden und mit *Cuscuta* parasitierten *A. thaliana*-Pflanze (Donorpflanze, Abb. 3-32A) in eine *A. thaliana*-Wildtyp-Pflanze (Akzeptorpflanze, Abb. 3-32B) über eine *Cuscuta*-Brücke untersucht worden. Die Brücke wurde durch das Überleiten des freien Endes der bereits 14 Tage an der Donorpflanze parasitierenden *Cuscuta*-Achse auf die Akzeptorpflanze erhalten. Nach einer Parasitierungsdauer von mindestens 14 und höchstens 30 Tagen an der Akzeptorpflanze (Wildtyp-*Arabidopsis*) wurde das Brückensystem in folgende Abschnitte zerschnitten, die für einen molekularbiologischen Nachweis des GFP über Western Blot aufgearbeitet wurden (Abb. 3-33A):

- 1 Rosettenblätter GFP-*A. thaliana*
- 2 *Cuscuta*-Haustorialstück mit GFP-*A. thaliana*-Infloreszenzachse
- 3 GFP-*A. thaliana* Infloreszenzachse oberhalb der Parasitierung mit 3 Blättern eines Seitentriebs
- 4 *Cuscuta*-Brücke
- 5 Rosettenblätter WT-*A. thaliana*
- 6 WT-*A. thaliana*-Infloreszenzachse unterhalb der Parasitierung
- 7 *Cuscuta*-Haustorialstück mit WT-*A. thaliana*-Infloreszenzachse
- 8 WT-*A. thaliana* Infloreszenzachse oberhalb der Parasitierung mit Endblüte, Blättchen, Seitentrieb mit 3 kleinen Blüten und Schoten
- 9 freie *Cuscuta*-Achse



Abb. 3-32: Parasitierte Donor- bzw. Akzeptorpflanze für die Untersuchung des GFP-Transports über eine *Cuscuta*-Brücke

- (A) **erfolgreich parasitierte GFP-*A. thaliana* (Donorpflanze)**  
Der GFP-Transport wird über eine *Cuscuta*-Brücke vermittelt. Die Brücke wurde durch das Überleiten der freien *Cuscuta*-Achse auf eine Akzeptorpflanze (B) erhalten.
- (B) **erfolgreich parasitierte WT-*A. thaliana* (Akzeptorpflanze)**

In Abb. 3-33B ist das Ergebnis des Western Blots dargestellt. Danach ist GFP, wie zu erwarten, in allen Abschnitten der Donorpflanze (Abb. 3-33 Abschnitt 1-3) vorhanden. Aufgrund einer zu geringen Konzentration konnte in der Parasitenbrücke kein GFP detektiert werden (Abb. 3-33 Abschnitt 4). Dennoch war das Protein in der Akzeptorpflanze im parasitierten Abschnitt der Blütenstandsachse und in den *sinks*, d.h. der Blüte und den sich bereits entwickelnden Schoten nachweisbar (Abb. 3-33 Abschnitt 7-8). In der freien *Cuscuta*-Achse war ebenfalls ein Nachweis des aus der Donorpflanze stammenden GFP möglich (Abb. 3-33 Abschnitt 9).

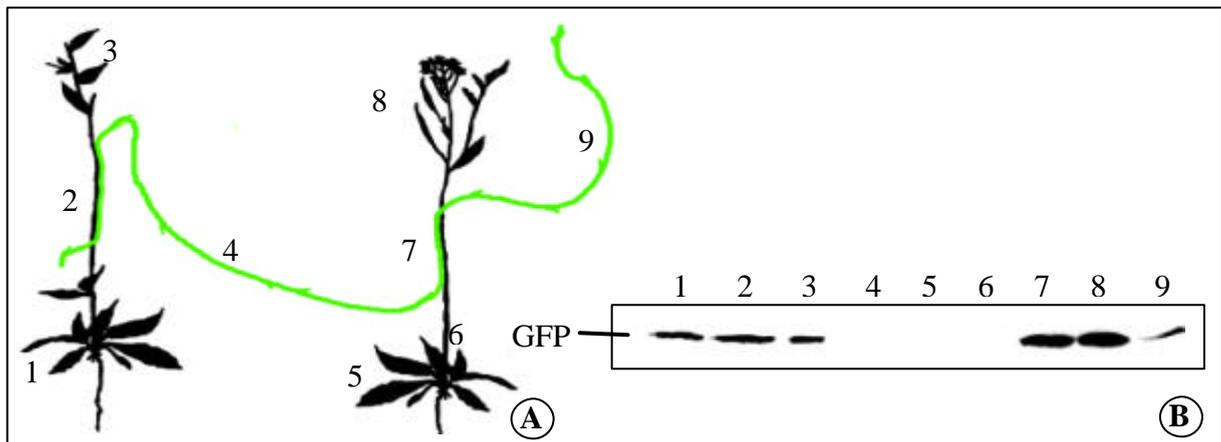


Abb. 3-33: GFP-Transport zwischen zwei Pflanzen von *A. thaliana* über eine *Cuscuta*-Brücke

- (A) Schema des Brückensystems zwischen einer transgenen (GFP exprimierenden) und einer WT-Pflanze von *Arabidopsis thaliana*.  
 (B) Qualitativer Nachweis des GFP mittels Western-Blot-Analyse.

Identische Mengen SDS solubilisierter Proteine der GFP exprimierenden *A. thaliana* (Kontrolle) sowie der Brücke und des Wildtyps (WT) wurden verwendet.

- 1 Rosettenblätter GFP-*A. thaliana*
- 2 *Cuscuta*-Haustorialstück mit GFP-*A. thaliana*-Infloreszenzachse
- 3 GFP-*A. thaliana*-Infloreszenzachse oberhalb der Parasitierung mit 3 Blättern eines Seitentriebs
- 4 *Cuscuta*-Brücke
- 5 Rosettenblätter WT-*A. thaliana*
- 6 WT-*A. thaliana*-Infloreszenzachse unterhalb der Parasitierung
- 7 *Cuscuta*-Haustorialstück mit WT-*A. thaliana*-Infloreszenzachse
- 8 WT-*A. thaliana*-Infloreszenzachse oberhalb der Parasitierung mit Endblüte, Blättchen, Seitentrieb mit 3 kleinen Blüten und Schoten
- 9 freie *Cuscuta*-Achse

### 3.2.4 Transport von Saccharose

Durch die Virus- und GFP-Brückenversuche konnte bereits gezeigt werden, dass ein Transport von Substanzen aus *Cuscuta* in den Wirt stattfindet.

In beiden Fällen erfolgte die Translokation über einen Zeitraum von mindestens 14 Tagen. Die Transportsubstanzen lagen zum Zeitpunkt der Infektion der zweiten Wirtspflanze (Akzeptorpflanze) bereits in den Achsen des Parasiten vor. Ihr Übergang konnte also sowohl über Suchhyphen bei der Ausbildung des Haustoriums an der zweiten Pflanze als auch ab dem 12. Tag der Parasitierung über die ausgebildete symplastische Verbindung zwischen den Phloemen des Wirtes und des Parasiten erfolgen.

In den folgenden Experimenten wurden Brückensysteme mit *Vicia faba* benutzt, bei denen die zweite Pflanze zum Versuchszeitpunkt bereits für mindestens 14 Tage mit *Cuscuta* parasitiert war, man also davon ausgehen konnte, dass eine funktionelle Verbindung der Leitgewebe bestand. Die freie *Cuscuta*-Achse mit Anschluss an die Akzeptorpflanze hatte eine durchschnittliche Länge von  $118,8 \pm 11,8$  cm.

Aus beiden Wirtspflanzen wurden Explantate hergestellt, die nur noch aus dem infizierten Internodium und einem oberhalb der Infektionsstelle inserierten Blatt bestanden (Abb. 3-34A). Die unteren Schnittflächen beider Explantate standen in Pufferlösung.

Auf das Blatt der ersten Wirtspflanze wurde  $^{14}\text{C}$ -Saccharose aufgetropft. Nach einer Translokationsdauer von 24 Stunden wurde das System in folgende Abschnitte zerteilt und für die Radioaktivitätsmessung nach folgendem Schema, siehe auch Abb. 3-34A, aufgearbeitet:

- **V1 oberhalb** =1. *Vicia*-Pflanze, Stengel oberhalb der Parasitierung
- **V1 parasitiert** =1. *Vicia*-Pflanze; parasitierter *Vicia*-Stengel mit Haustorialkeilen
- ***Cuscuta* Haustorialstück 1** =*Cuscuta*-Haustorialstück ohne Haustorialkeile an der 1. Wirtspflanze
- **V1 unterhalb** =1. *Vicia*-Pflanze, Stengel unterhalb der Parasitierung
- ***Cuscuta*-Brücke**
- **V2 oberhalb** =2. *Vicia*-Pflanze, Stengel oberhalb der Parasitierung
- **V2 parasitiert** =2. *Vicia*-Pflanze; parasitierter *Vicia*-Stengel mit Haustorialkeilen
- ***Cuscuta* Haustorialstück 2** =*Cuscuta*-Haustorialstück ohne Haustorialkeile an der 2. Wirtspflanze
- **V2 unterhalb** =2. *Vicia*-Pflanze, Stengel unterhalb der Parasitierung
- freie ***Cuscuta*-Achse**

Die Abb. 3-34B zeigt das Verteilungsmuster der radioaktiv markierten Saccharose innerhalb des Brückensystems. 14 Tage nach Parasitierung der zweiten Wirtspflanze erfolgt noch ein umfangreicher Transport von Saccharose aus der ersten *Vicia*-Pflanze in den Parasiten. Die freie *Cuscuta*-Achse enthält  $45,0 \pm 6,7$  % der transportierten Verbindung. Auch in das parasitierte Internodium und in die Stengelabschnitte ober- und unterhalb der Parasitierung der zweiten Wirtspflanze konnte zweifelsfrei ein Transport nachgewiesen werden.

Die in diesen Abschnitten gemessene Radioaktivität lag stets in einer Größenordnung, bei der eine Verunreinigung durch die Aufarbeitung ausgeschlossen werden kann. Im *Vicia*-Stengel konnte oberhalb der Parasitierung durchschnittlich ein Wert von  $1368 \pm 459$  dpm, unterhalb der Parasitierung von  $1487 \pm 606$  dpm detektiert werden.

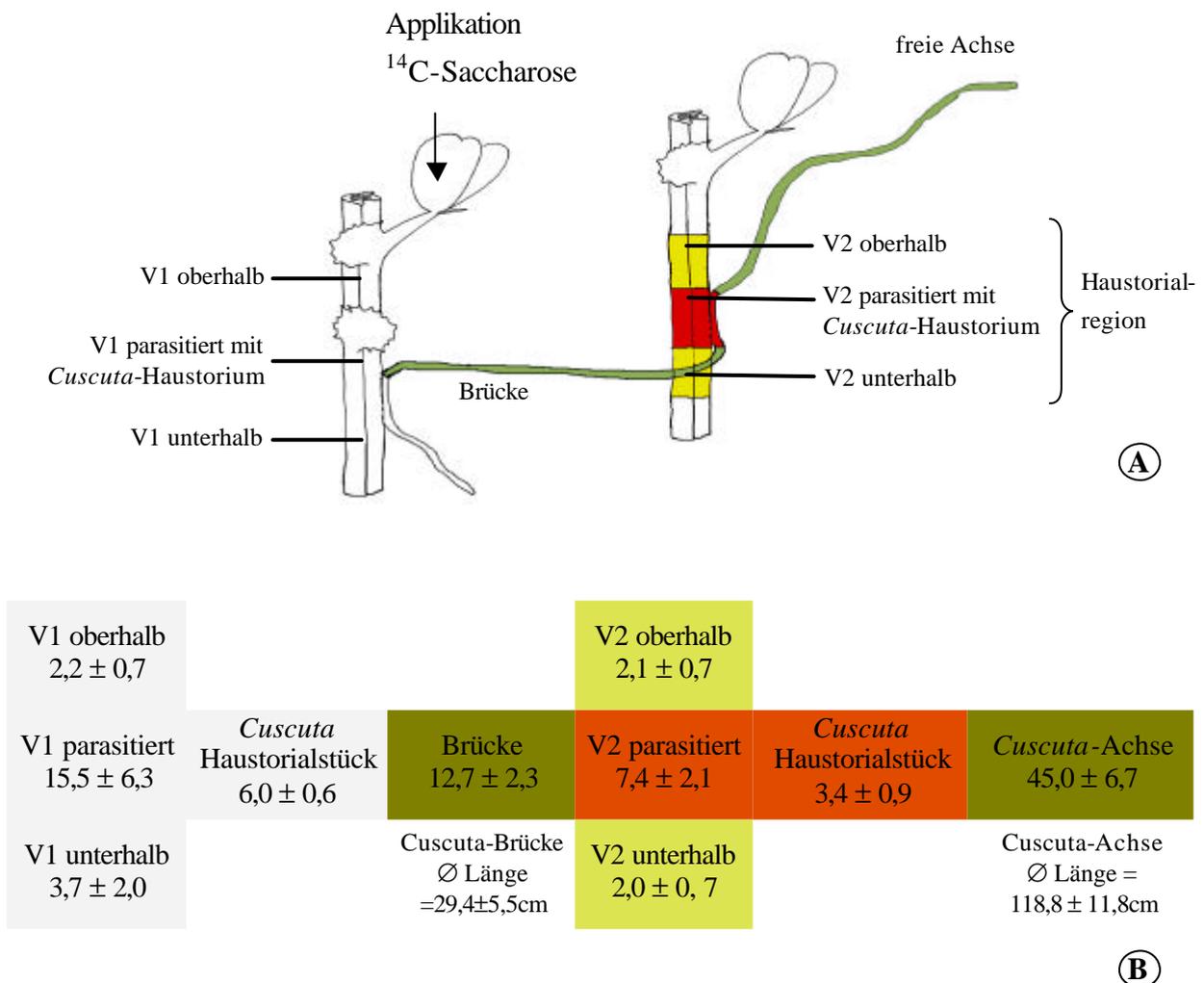


Abb. 3-34: Brückensystem *Vicia faba*-*Cuscuta reflexa*-*Vicia faba*

- (A) Schematische Darstellung des Brückensystems und der Aufarbeitung  
 (B) prozentuale Verteilung der transportierten radioaktiven Saccharose im Brückensystem

Die Explantate standen während des Versuches in Pufferlösung; n = 9, mean  $\pm$  SE

Besonders hoch war der Anteil an radioaktiv markierten Verbindungen im durch *Cuscuta* infizierten Stengelabschnitt, der die Haustorialkeile enthält (V2 parasitiert). Setzt man die in der gesamten Haustorialregion (V2 oberhalb, V2 parasitiert, V2 unterhalb) der zweiten Pflanze gemessene Radioaktivität gleich 100 %, so entfallen 72,9 % auf diesen Abschnitt, auf die oben und unten angrenzenden *Vicia*-Abschnitten 27,1 %.

Die in der zweiten *Vicia*-Pflanze vorliegenden radioaktiv markierten Verbindungen sind das Ergebnis eines seitlichen Transports aus dem Phloem des als Haustorialstück bezeichneten Abschnitts der *Cuscuta*-Achse. Offensichtlich stellt dieser Teil innerhalb der Parasitenachse

einen zusätzlichen *sink* dar. Das wird deutlich, wenn man die in den einzelnen Abschnitten des Parasiten gemessene Radioaktivität auf ihre Frischmasse bezieht. Die dabei erhaltenen Werte sind in Tab. 3-14 dargestellt.

**Tab. 3-14: Verteilung der Radioaktivität in ausgewählten Abschnitten des Brückensystems *Vicia faba-Cuscuta reflexa-Vicia faba* (Einzelheiten im Text).**

Abschnitt	FM [mg]	dpm	dpm/mg FM
Brücke (Länge=29,4 ± 5,5 cm)	665	11310 ± 3229	17 ± 8
Haustorialstück	329	10517 ± 3034	31 ± 9
freie <i>Cuscuta</i> -Achse (Länge=118,8 ± 11,8 cm)	523	38196 ± 8531	73 ± 16

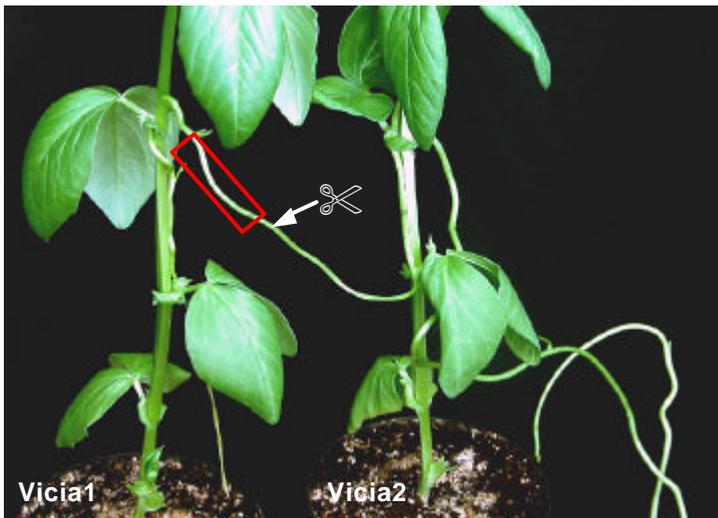
n=9, mean ± SE

Nimmt man eine Zonierung innerhalb der durchschnittlich 118,8 ± 11,8 cm langen freien Achse vor, so wird für den unmittelbar an das Haustorialstück angrenzenden 10 cm langen Achsenabschnitt ein Wert von 4 ± 1 dpm/mg FM (=5,1 % des Gehalts der gesamten freien Achse) für einen gleichgroßen apikalen Bereich dagegen ein Wert von 24 ± 7 dpm/mg FM (=33,5 % des Gehalts der gesamten freien Achse) erhalten.

Bei diesen Berechnungen wird deutlich, dass die Brücke und der an den Haustorialbereich unmittelbar anschließende *Cuscuta*-Abschnitt ausschließlich Transportfunktion besitzen. In ihnen findet keine Akkumulation der transportierten Verbindungen statt. Das Haustorialstück sowie die wachsende Spitze stellen innerhalb der *Cuscuta*-Achse zwei *sinks* dar.

Da bekannt ist, dass phloemmobile Fluoreszenzfarbstoffe und Assimilate gemeinsam im Phloem transportiert werden und nach dem gleichen Muster zwischen *source* und *sink* verteilt werden, ist es möglich, den Weg, über den die Saccharose aus dem Parasiten in die zweite Wirtspflanze gelangt, durch Fluoreszenzfarbstoffe, wie Carboxyfluorescein mikroskopisch darzustellen. Dazu wurde der Ester dieses Farbstoffes (CFDA) in die Brücke eingespritzt bzw. das nach dem Durchtrennen der Brücke entstandene frische und vor allem vitale *Cuscuta*-Ende direkt in die Farbstofflösung eingestellt.

Das Einspritzen von CFDA erfolgte in einer Entfernung von 10-15 cm zum Haustorium der zweiten durch *Cuscuta* parasitierten *Vicia*. Für die Applikation durch Einstellen des freien Endes in eine CFDA-Lösung wurde die Brücke so durchtrennt, dass ebenfalls ein ca. 15 cm langes freies Ende entstand (Abb. 3-35). Dieses befand sich mit max. 0,7 cm in der Farbstofflösung. Nach einer Versuchsdauer von 14 Stunden wurden Handschnitte der Haustorialregion angefertigt und mittels konfokaler *laser scanning* Mikroskopie ausgewertet. Die in Abb. 3-36 dargestellte Fluoreszenzaufnahme zeigt eine Übersicht der Haustorialregion. Deutlich ist der Weg des an die *Cuscuta* applizierten Fluoreszenzfarbstoffs zu erkennen, er markiert die Phloembahnen zwischen *Cuscuta* und *Vicia*.



 Bereich, in den CFDA eingespritzt wurde

 Schnittstelle → Das neue, basale Ende der *Cuscuta* wurde in eine CFDA-Lösung gestellt.

Abb. 3-35: Brückensystem *Vicia faba-Cuscuta reflexa*

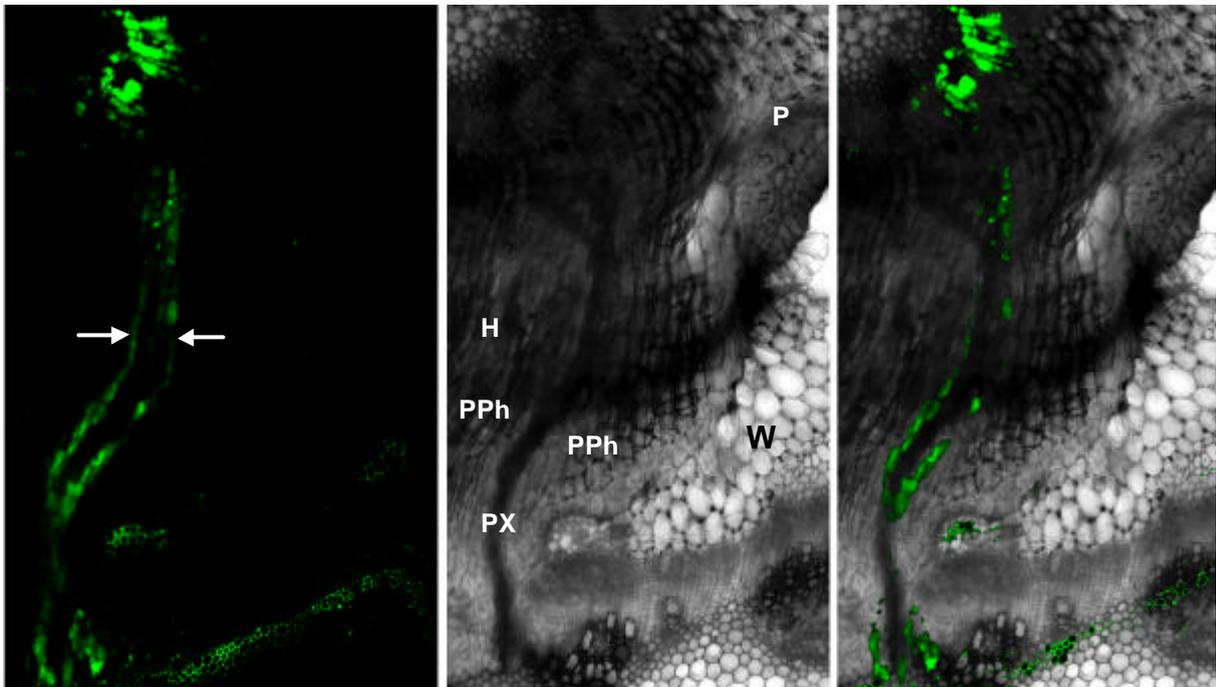


Abb. 3-36: Haustorialregion des Wirt-Parasit-Systems *Vicia faba-Cuscuta reflexa*

Transport von Carboxyfluorescein aus dem Parasiten in den Wirt.

Das *Cuscuta*-Haustorium hat an die Leitelemente der *Vicia* angeschlossen. Der im Haustorialzapfen zentral verlaufende Xylemstrang (im Transmissionsbild dunkel erscheinend) und die ihn umgebenden Phloemelemente sind gut sichtbar. Das Phloem in der quer angeschnittenen *Cuscuta*-Achse sowie im längs geschnittenen Haustorium (links und rechts vom Xylem) ist deutlich durch das an die *Cuscuta*-Achse applizierte Carboxyfluorescein markiert.

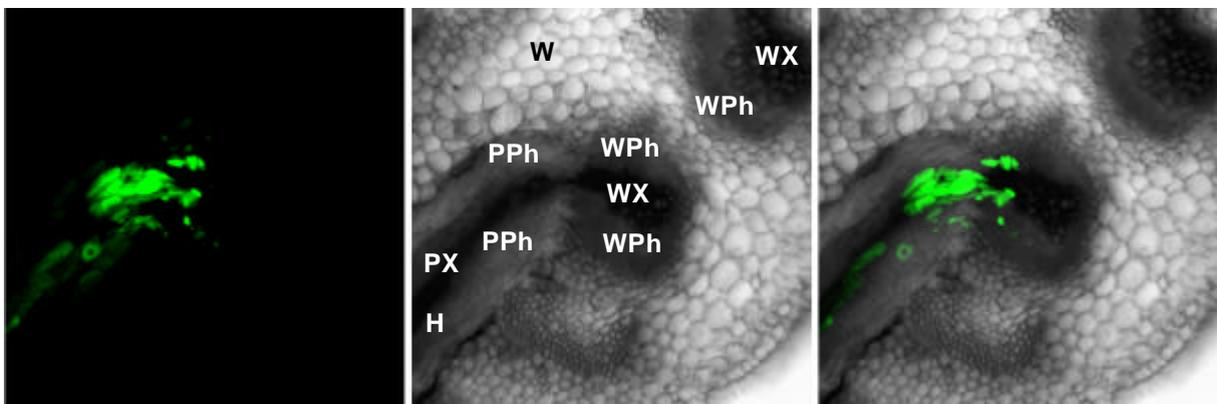
P=Parasitenachse (quer), H=Haustorium (längs), W=Wirtsachse (quer), PX=Parasiten-Xylem, PPh=Parasiten-Phloem (Pfeile im Fluoreszenzbild)

Im Fluoreszenzbild ist neben der CF-Fluoreszenz die Autofluoreszenz des Xylems sichtbar.

In Abb. 3-37 ist ein Schnitt durch das Haustorium und ein durch *Cuscuta* parasitiertes *Vicia*-Eckleitbündel des Stengels dargestellt. Auch hier ist sichtbar, dass der an *Cuscuta* applizierte phloemmobile Fluoreszenzfarbstoff Carboxyfluorescein über das Phloem des Parasiten zum Phloem des *Vicia*-Leitbündels transportiert wird.

Bei Betrachtung der Abb. 3-37 könnte zunächst der Eindruck entstehen, dass die in der Spitze des Haustoriums auftretende Fluoreszenz im Xylem lokalisiert ist. Das entspricht jedoch nicht den Tatsachen. In den Leitbündeln des Haustoriums sind allseitig um den zentralen Xylemstrang zahlreiche Phloemelemente angeordnet (s. auch Abb. 3-15).

Die in dem vorliegenden Schnitt beobachtete Fluoreszenz ist den über dem Xylem liegenden Phloemelementen zuzuordnen, die bei der nicht genau medianen Schnittebene durch das Haustorium mit angeschnitten wurden.



**Abb. 3-37:** *Vicia faba-Cuscuta reflexa*

**Querschnitt durch ein mit *Cuscuta reflexa* parasitiertes Leitbündel von *Vicia faba* nach Applikation von CFDA an den Parasiten.**

CF-Fluoreszenz ist im *Cuscuta*-Haustorium in den um den zentralen Xylemstrang (im Transmissionsbild dunkel erscheinend) angeordneten Phloemelementen und im Phloem des *Vicia*-Bündels (grau erscheinend) nachweisbar.

H=Haustorialkeil von *Cuscuta* (längs), W=*Vicia faba* Stengelparenchym, PPh=Parasiten-Phloem, PX=Parasiten-Xylem, WPh=Wirt's-Phloem, WX=Wirt's-Xylem

### 3.3 Zelluläre Strukturen

#### 3.3.1 Suchhyphen

An den Kontaktstellen zwischen Wirt und Parasit kommt es zur Ausbildung der sprossbürtigen Haustorien, die keilförmig in das Wirtsgewebe hineinwachsen. Das Rindenparenchym des Parasiten wächst dabei papillenartig aus und dringt in das Gewebe des Wirtes ein. Im apikalen Bereich des Haustorialkeils ist eine Aufgliederung in zahlreiche einzelne hyphenartige Zellstränge zu beobachten (Abb. 3-38). Diese sogenannten Suchhyphen breiten sich im Wirtsgewebe sowohl inter- als auch intrazellulär aus (Abb. 3-39). Sie sind stets von einer eigenen Zellwand und der des Wirtes umgeben. Durch überproportionales Längenwachstum stellen sie Kontakt mit dem Leitgewebe des Wirtes her. Die Suchhyphe differenziert sich zur Kontakthyphe.

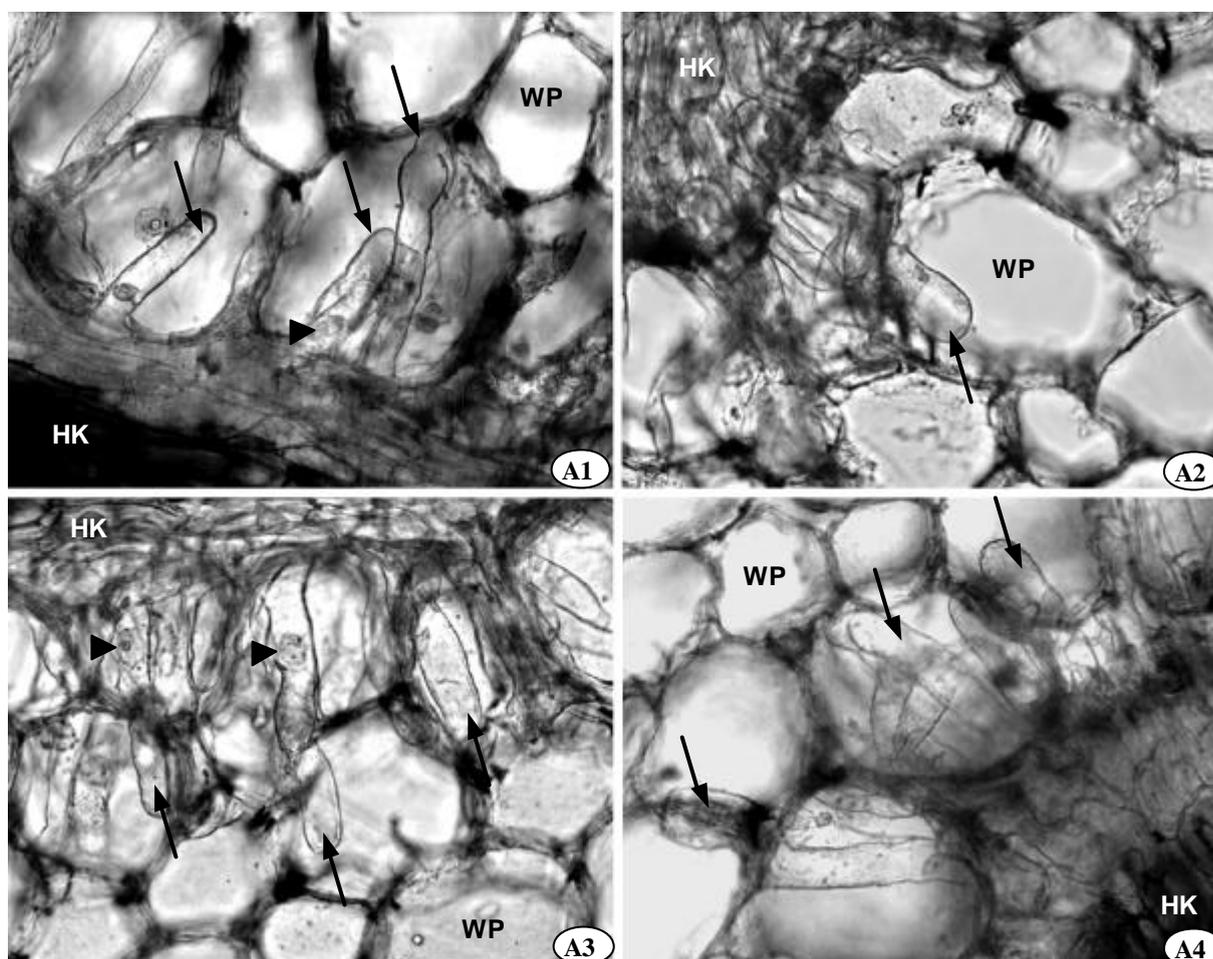


Abb. 3-38: Suchhyphen von *Cuscuta reflexa* im Parenchym von *Nicotiana tabacum*

Im Wirtsparenchym kommt es zur Aufgliederung des apikalen Haustorialbereiches in einzelne hyphenartige Zellstränge, die sogenannten Suchhyphen (Pfeile). Diese sind stets einzellig und wachsen in alle Richtungen. Dabei ist sowohl ein Durchwachsen von Parenchymzellen (intrazelluläres Wachstum) als auch ein Wachstum zwischen den Zellen zu beobachten (interzelluläres Wachstum). In den Suchhyphen ist der große Zellkern erkennbar (▶ A1 und A3).

HK=Haustorialkeil, WP=Wirtsparenchymzelle des Stengels von *Nicotiana tabacum*; [Vergrößerung: 20x]

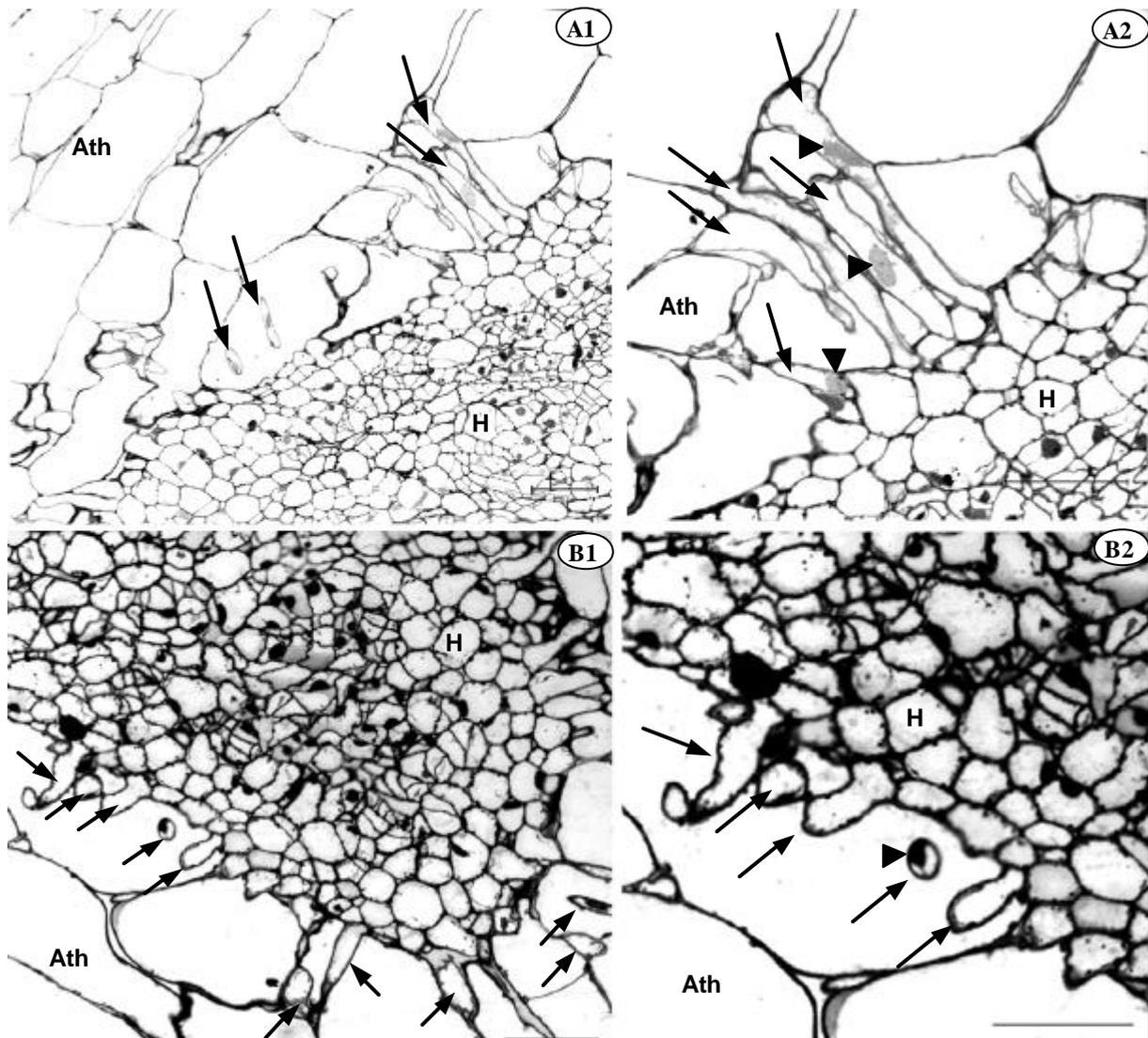


Abb. 3-39: Suchhyphen von *Cuscuta reflexa* im Parenchym von *Arabidopsis thaliana*

Querschnitt durch das Haustorium von *Cuscuta reflexa*

- (A1+B1) Haustorium (H) im Parenchym von *Arabidopsis thaliana* (Ath). Es sind die vom Haustorialkeil nach allen Seiten interzellulär und intrazellulär ins Parenchym wachsenden Suchhyphen (Pfeile), erkennbar.
- (A2+B2) Ausschnittsvergrößerung aus A1 bzw. B1. Deutlich ist der große Zellkern der einzelligen Suchhyphen erkennbar (▶). [bar jeweils 100µm].

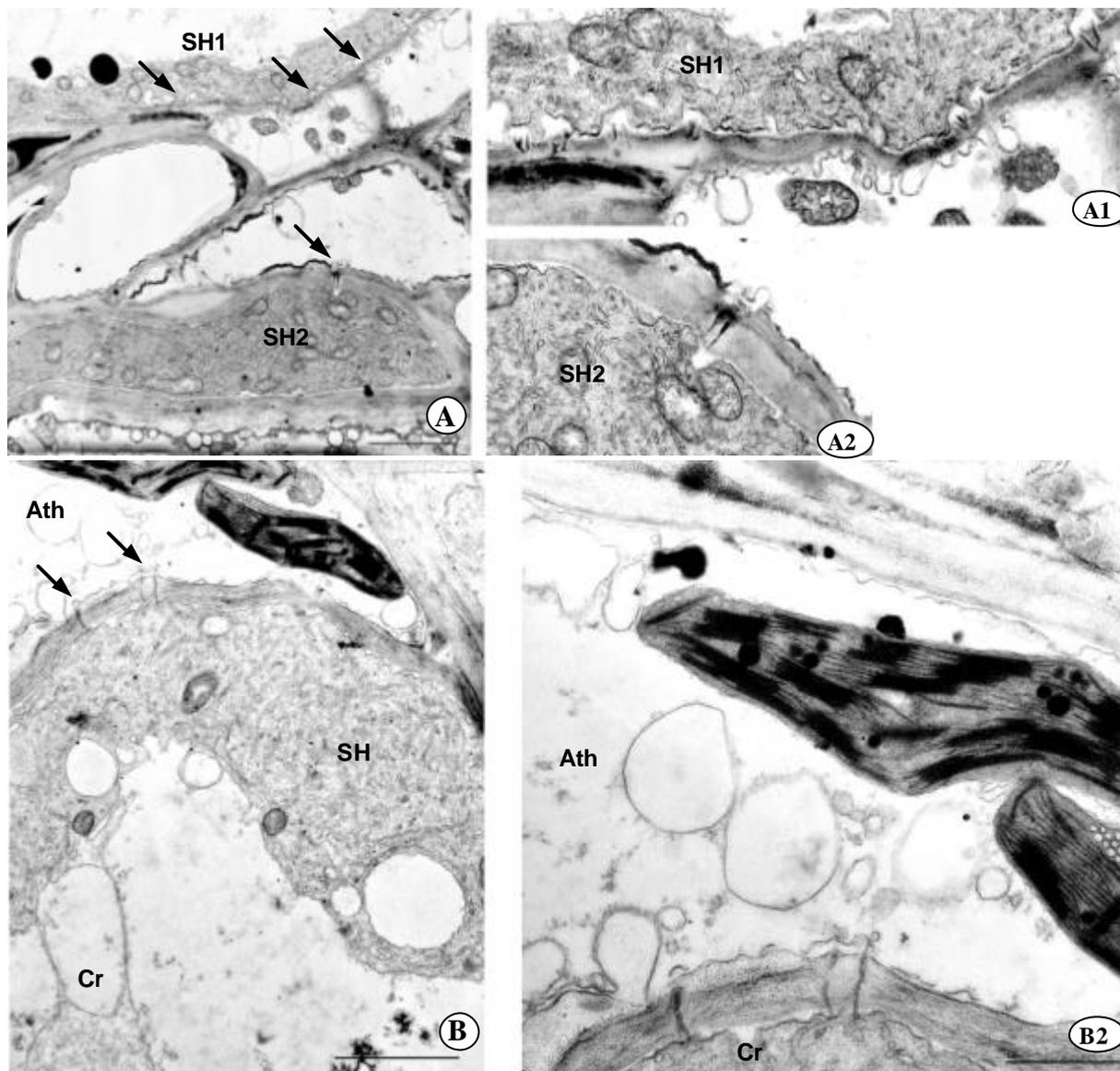
Die Feinstruktur der Suchhyphen von *Cuscuta reflexa* ist in den Wirtspflanzen *Arabidopsis thaliana* und *Nicotiana tabacum* licht- und elektronenmikroskopisch untersucht worden.

Die Suchhyphen können in Bau und Feinstruktur folgendermaßen charakterisiert werden:

Sie sind stets einzellig und wachsen in alle Richtungen. Der apikale Bereich ist stark strukturiert, enthält viel endoplasmatisches Reticulum und zahlreiche Mitochondrien. Der basale Teil der Zelle weist einen auffallend großen Kern sowie eine zentrale Vakuole auf (Abb. 3-40A und B).

Die Wand der Hyphe wird von feinen plasmatischen Strukturen -Plasmodesmen- durchzogen, die Wirts- und Parasitenprotoplasten direkt miteinander verbinden. Für beide Wirt-Parasit-

Systeme konnten Plasmodesmen in den Wänden der Suchhyphen elektronenmikroskopisch dargestellt werden (Abb. 3-40 und 3-41). Dass die Suchhyphye beim Wachstum sowohl zwischen den Zellwänden als auch durch das Lumen der Wirtszellen, von einer eigenen Zellwand und der Zellwand des Wirtes umgeben ist, konnte besonders deutlich durch elektronenmikroskopische Untersuchungen am Wirt-Parasit-System *Nicotiana-Cuscuta* gezeigt werden (Abb. 3-41).



**Abb. 3-40:** Suchhyphen von *Cuscuta reflexa* in Parenchymzellen von *Arabidopsis thaliana*

Zwischen Suchhyphen und Parenchymzellen des Wirtes treten Plasmodesmen auf (Pfeile), die in (A1) und (A2) bzw. (B2) vergrößert dargestellt wurden.

(A) bzw. (A2) → SH2

Suchhyphen mit stark strukturiertem Protoplast im apikalen Bereich, quer geschnittenem endoplasmatischem Reticulum und zahlreichen Mitochondrien basaler Teil mit zentraler Vakuole,

(A) → SH1 bzw. (B) → SH

Cr=*Cuscuta reflexa*, Ath=*Arabidopsis thaliana*, SH=Suchhyphye;

(A1) bar=2,90µm; (B) bar=2,3µm; (B2) bar=0,91µm

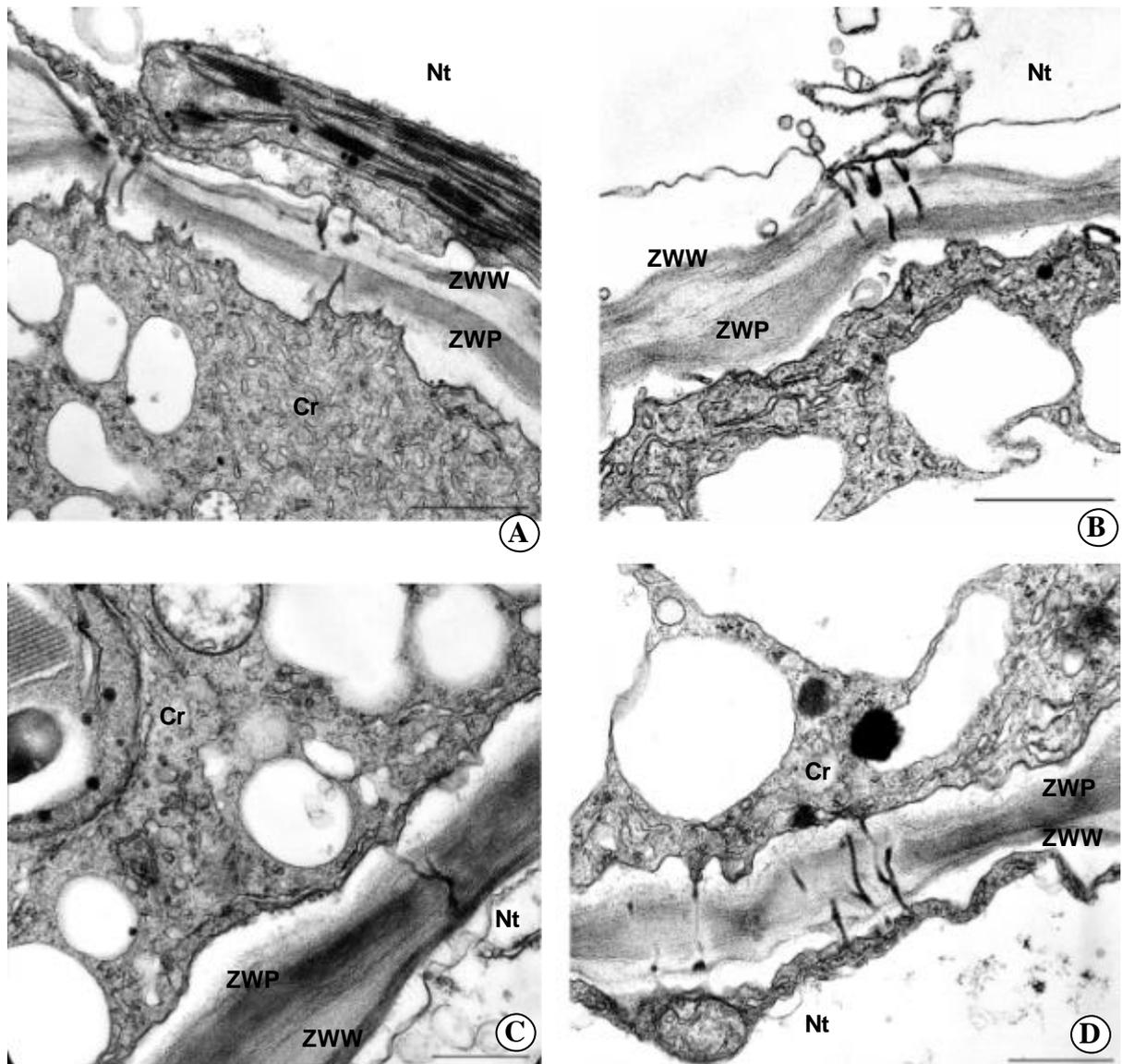


Abb. 3-41: Suchhyphen von *Cuscuta reflexa* in Parenchymzellen von *Nicotiana tabacum*

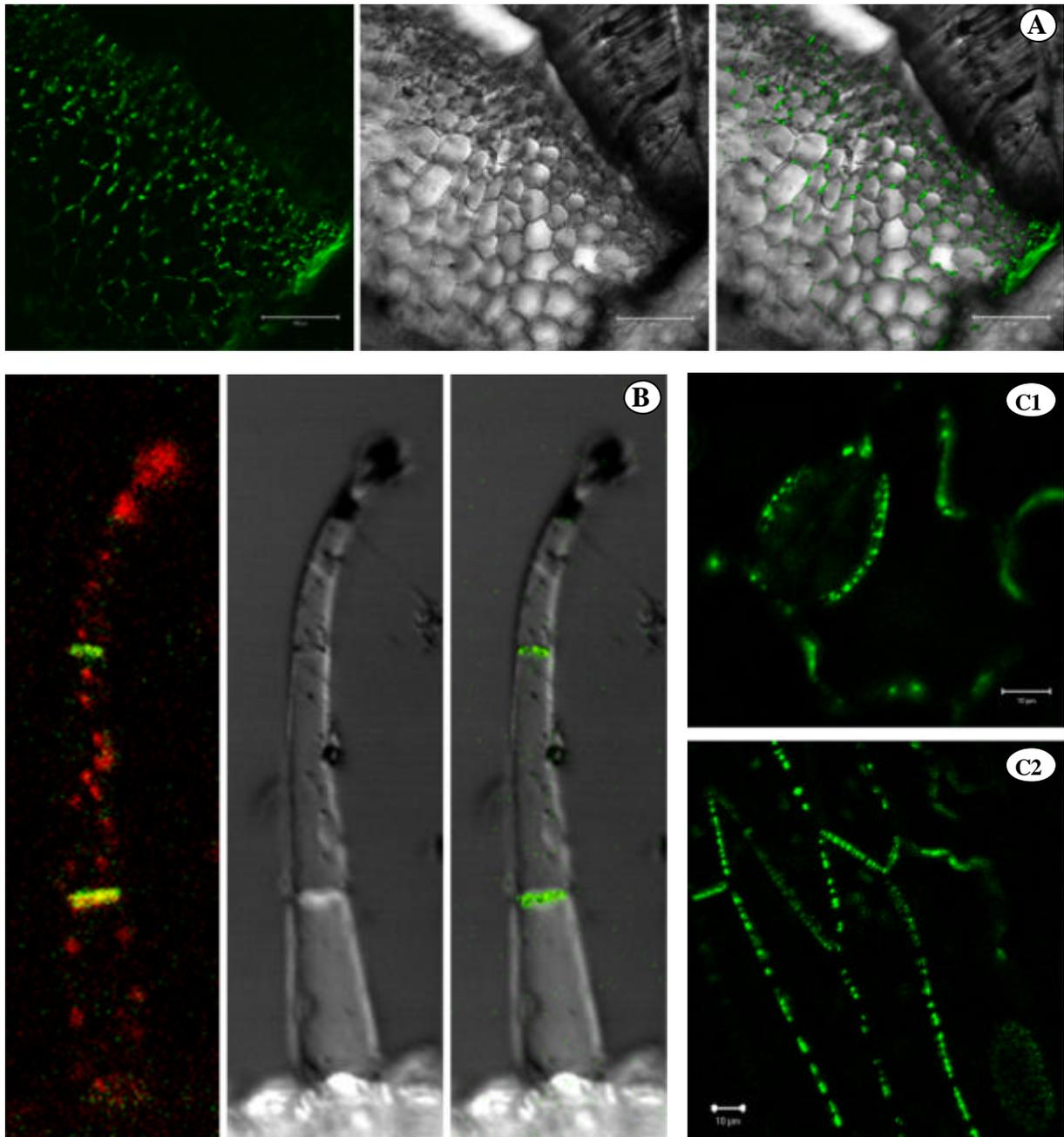
Zwischen den elektronendicht strukturierten *Cuscuta*-Suchhyphen und *Nicotiana*-Parenchymzellen treten Plasmodesmen in den Wänden auf. Man kann deutlich die Zellwand des Wirtes von der des Parasiten unterscheiden, durch die sich die Plasmodesmen erstrecken.

Cr=*Cuscuta reflexa*, Nt=*Nicotiana tabacum*, ZWW=Zellwand des Wirtes, ZWP=Zellwand des Parasiten;

(A) und (B) bar=0,91 $\mu$ m, (C) bar=0,58 $\mu$ m, (D) bar=0,73 $\mu$ m

Durch Parasitierung von transgenen Tabakpflanzen (TMV MP-GFP *N. tabacum* cv. xanthi), die eine Fusion des *movement protein* des Tabakmosaikvirus mit GFP (MP-GFP) exprimieren, konnte gezeigt werden, dass es sich bei den sekundär ausgebildeten Plasmodesmen zwischen Tabak und *Cuscuta* um verzweigte Plasmodesmen handelt, da nur diese durch das MP-GFP markiert werden (ATKINS ET AL 1991, DING ET AL 1992, OPARKA ET AL 1996a, 1996b, PADGETT ET AL 1996). Auch innerhalb der Wirtspflanze erscheinen alle sekundären Plasmodesmen durch das MP-GFP markiert. So ist eine punktförmige GFP-Markierung in den aneinandergrenzenden Zellwänden der Parenchymzellen des Stengels zu

erkennen (Abb. 3-42A), In den Trichomen sind nur die Plasmodesmen in den Zellwänden der aneinandergrenzenden Zellen und nicht in den lateralen Zellwänden markiert (Abb. 3-42B). Punktförmige GFP-Fluoreszenz war auch zwischen den Zellwänden von Epidermiszellen, in der an die Schließzellen angrenzenden Epidermiszellwand sowie in den Wänden von Blattnerven (Abb. 3-42C1 bzw. C2) erkennbar.



**Abb. 3-42: Markierung verzweigter Plasmodesmen in TMV MP-GFP *Nicotiana tabacum* Pflanzen**

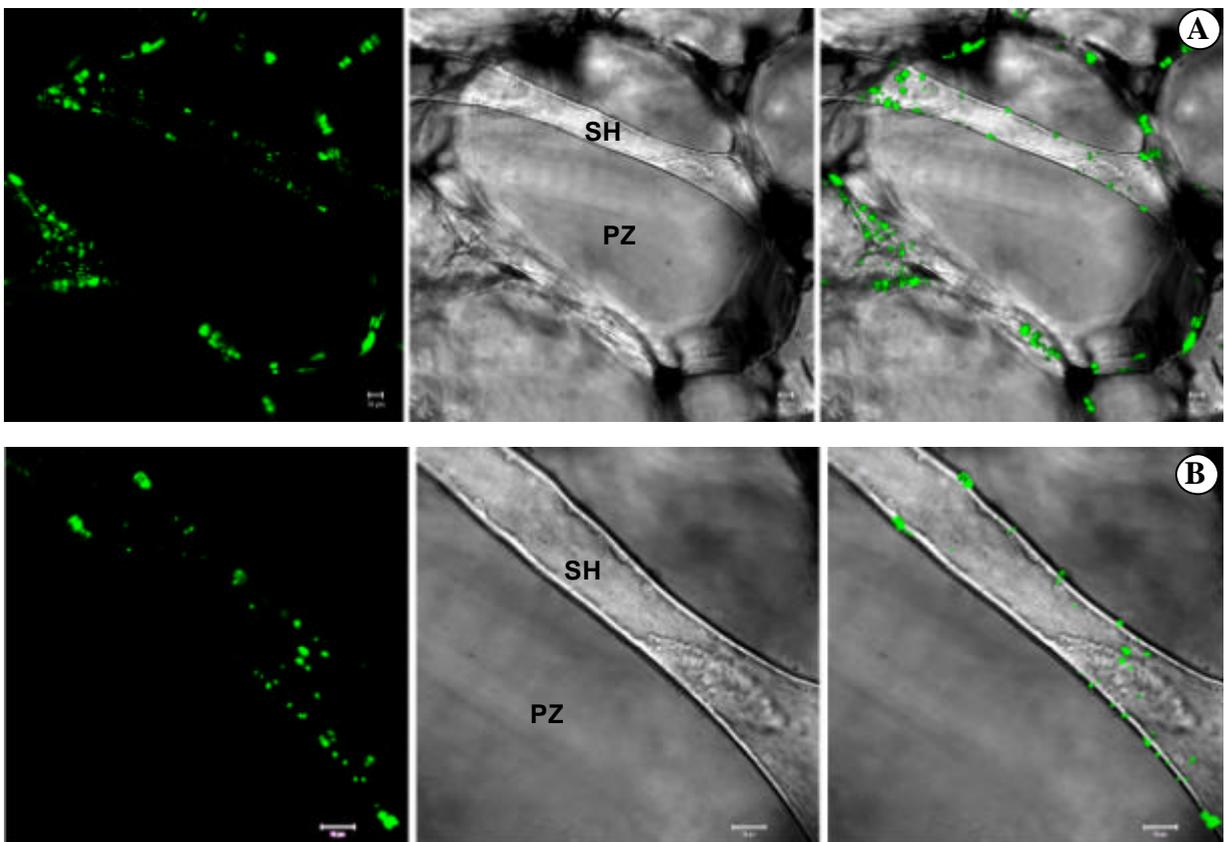
**GFP-Fluoreszenz in:**

- (A) Zellwänden aneinandergrenzender Parenchymzellen
- (B) Zellwänden aneinandergrenzender Zellen in Trichomen, aber nicht in den lateralen Zellwänden
- (C1) Zellwänden zwischen Epidermiszellen und in den Schließzellen angrenzenden Epidermiszellwand
- (C2) Wänden von Blattnerven

(A) bar=100µm, (C1)+(C2) bar=10µm; (B): rot=Chlorophyllfluoreszenz

Wir betrachteten Handschnitte von mit *Cuscuta* parasitierten *Nicotiana*-Stengeln im konfokalen *laser scanning* Mikroskop. In Abb. 3-43 sind die Fluoreszenz- und Transmissionsaufnahmen dargestellt. Deutlich ist in den Zellwänden zwischen den Parenchymzellen von Tabak sowie in den Zellwänden der in der Parenchymzelle wachsenden Suchhyph eine punktförmige GFP-Fluoreszenz als Indikator für verzweigte Plasmodesmen zu erkennen.

Neben den in den Fluoreszenzaufnahmen dargestellten Plasmodesmen, die durch MP-GFP-Markierung sowie elektronenmikroskopische Untersuchungen eindeutig als verzweigte Plasmodesmen charakterisiert werden können, scheinen vereinzelt auch einfache Plasmodesmen in den Wänden der Suchhyphen aufzutreten (Abb. 3-40B2). Aufgrund der verschiedenen Schnittebenen ist ihr Vorkommen jedoch nicht eindeutig belegbar.



**Abb. 3-43: Markierung verzweigter Plasmodesmen in den Zellwänden von Suchhyphen**

TMV MP-GFP markierte Plasmodesmen sind als grüne Fluoreszenzpunkte in den Zellwänden aneinander angrenzender Parenchymzellen (A) und in den Wänden von im Parenchym wachsenden Suchhyphen (A+B) erkennbar.

- (A) Suchhyph in einer Parenchymzelle von *Nicotiana tabacum*
- (B) Ausschnittsvergrößerung der Suchhyph aus (A)

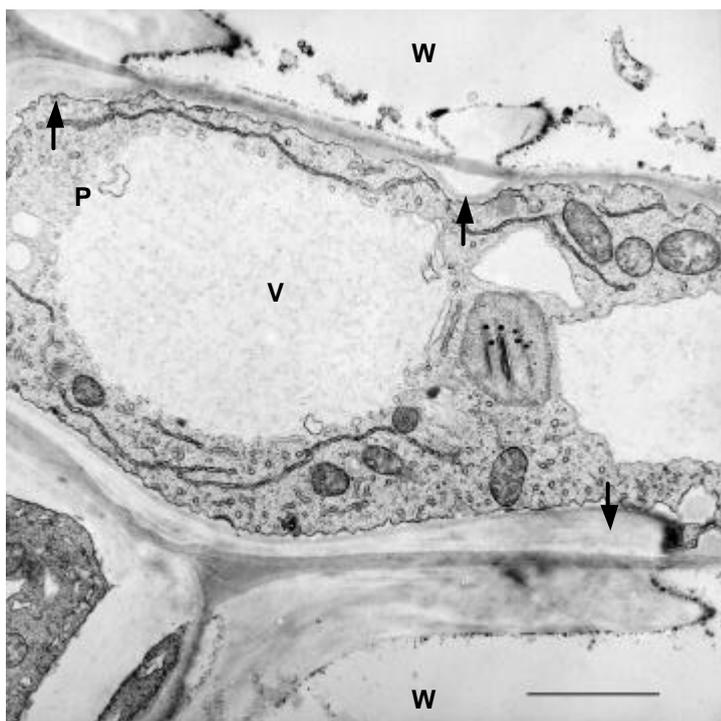
SH=Suchhyph, PZ=Parenchymzelle des Tabakstengel; bar jeweils 10µm

### 3.3.2 Differenzierung der Leitgewebe

Diese Untersuchungen wurden am Wirt-Parasit-System *Vicia faba-Cuscuta reflexa* durchgeführt.

*Cuscuta* dringt mit dem Haustorium in das Wirtsgewebe ein. Im apikalen Bereich erfolgt die Ausbildung von zahlreichen Suchhyphen, die durch schnelles Wachstum den Kontakt zum Wirtsleitgewebe ermöglichen. Bei Kontakt der Hyphen mit den Wirtselementen beginnt im Haustorium die Differenzierung der entsprechenden Leitelemente für den Wasser- bzw. Assimilattransport.

Bei Hyphen, die in Kontakt mit den Leitelementen des Wirtsxylems stehen, können sekundäre Wandverdickungen der Zellwände beobachtet werden. In Abb. 3-44 ist eine zwischen zwei Xylemelementen des Wirtes wachsende *Cuscuta*-Hyphenzelle dargestellt. An den Zellwänden sind sekundäre lokale Wandverdickungen zu erkennen, die korrespondierend zu den bereits bestehenden Verdickungen des Wirtes angelegt werden. Neben der Ausbildung dieser charakteristischen Wandverstärkungen ist die beginnende Degeneration des Protoplasten anhand der bereits aufgelösten Tonoplastenmembran zu erkennen.



**Abb. 3-44: *Vicia faba-Cuscuta reflexa***

#### **Differenzierung von Xylemelementen des Parasiten.**

*Cuscuta*-Hyphenzelle zwischen zwei Xylemelementen des Wirtes. Durch Auflagern von Wandmaterial kommt es zu korrespondierenden lokalen Wandverdickungen (Pfeile).

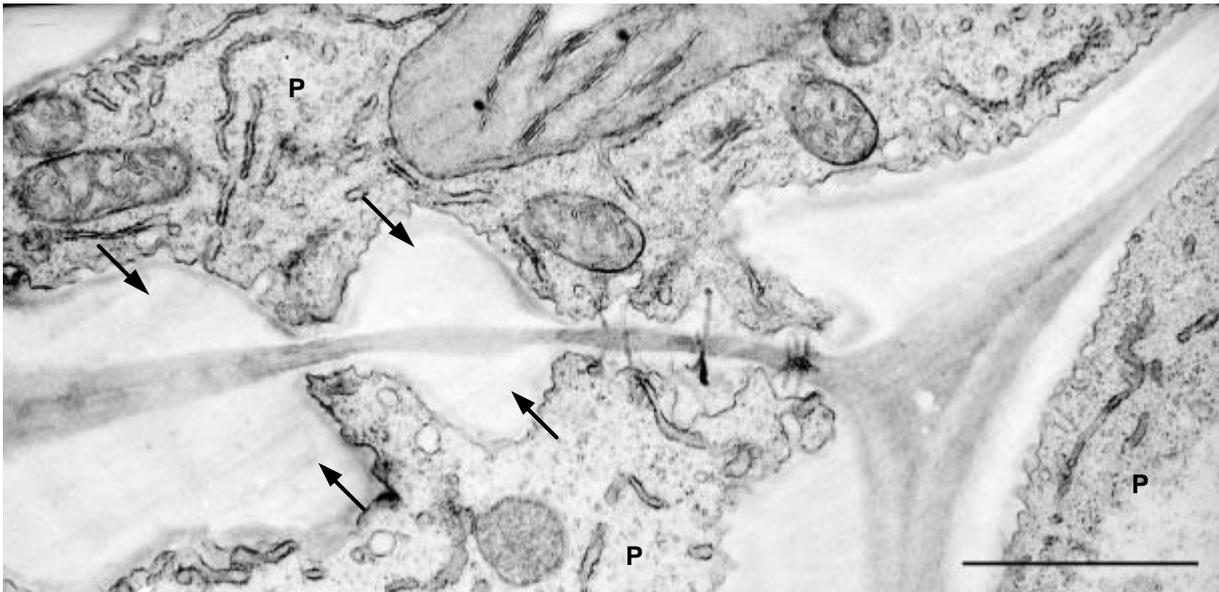
W= Xylemelementen des Wirtes

P=*Cuscuta*-Hyphenzelle

V=Vakuole ohne Tonoplastenmembran

bar=2,30 µm

Auch innerhalb des Haustoriums entstehen Xylemelemente. Abb. 3-45 zeigt die Anlage von einander korrespondierenden lokalen Wandverdickungen in zwei benachbarten Parasitenzellen. Auf diese Weise entsteht eine durchgehende offene Verbindung zwischen den Xylemelementen des Wirtes und des Parasiten, die durch Applikation von Texas red im Fluoreszenzmikroskop dargestellt wurde (Abb. 3-4).



**Abb. 3-45: Differenzierung von Xylemelementen innerhalb von *Cuscuta reflexa***

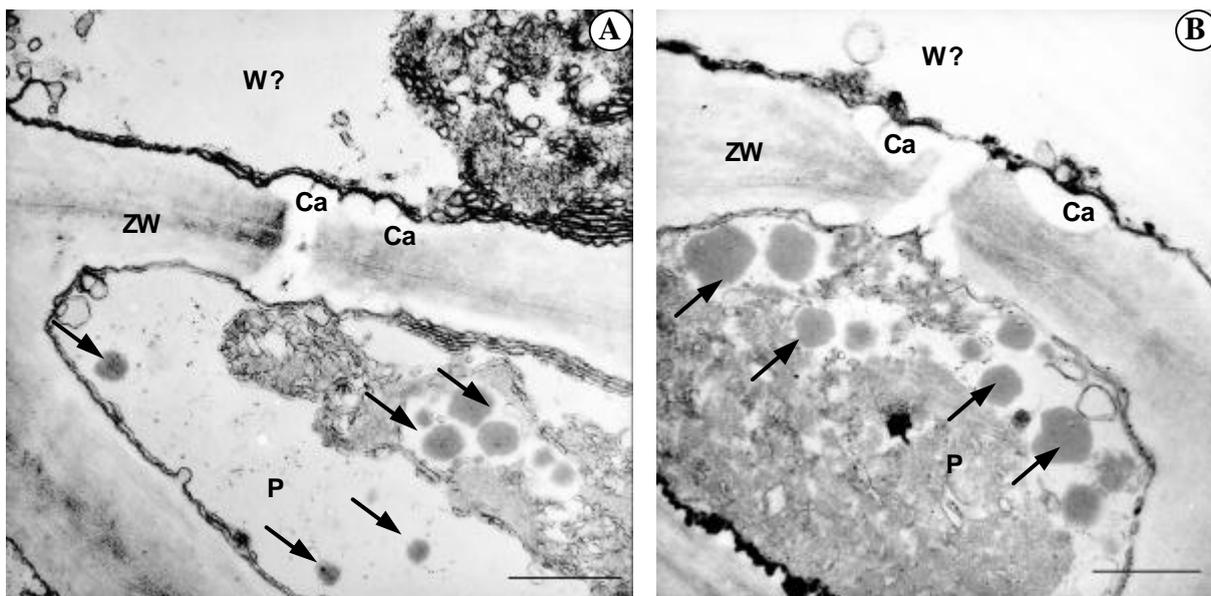
Zwei benachbarte *Cuscuta*-Zellen innerhalb des Haustorialbereiches. Die strukturelle Differenzierung zu Xylemelementen ist anhand der korrespondierenden lokalen Wandverdickungen (Pfeile) erkennbar.

P=*Cuscuta*-Zellen; bar=1,81  $\mu$ m

Auch für das Phloem konnte durch den ungehinderten Transport von Fluoreszenzfarbstoffen, Viren und GFP ein durchgehender Transportweg nachgewiesen werden (Abb. 3-14). Der eindeutige elektronenmikroskopische Nachweis der zellulären Strukturen für eine solche Verbindung ist jedoch außerordentlich schwierig. Wir haben häufig Zellen in unmittelbarer Nachbarschaft zu Siebelementen gefunden, die aufgrund spezifischer Marker eindeutig als *Cuscuta*-Zellen anzusprechen waren (Abb. 3-46). Zwischen beiden Zellen und an den Zellwänden waren Callose-Auflagerungen sichtbar, die als Zeichen für die Ausbildung einer offenen Verbindung in Form von Siebporen gedeutet werden können. In der *Cuscuta*-Zelle sind mit der beginnenden Degeneration der Tonoplastenmembran und der Cytosomen Anzeichen für eine Differenzierung zu einem Siebelement zu erkennen (Abb. 3-46A).

Um das Siebelement eindeutig dem Wirt zuzuordnen zu können, sind charakteristische Marker, wie z.B. Phloemplastiden notwendig. Diese haben wir bisher in den Schnitten nicht gefunden. Für eine Zugehörigkeit der Zelle zum Wirt spricht der unterschiedliche Differenzierungszustand der beiden Zellen. Bei der Ausbildung des Anschlusses trifft die *Cuscuta*-Hyphe auf eine vollständig differenzierte Siebröhre des Wirtes und beginnt sich zu differenzieren.

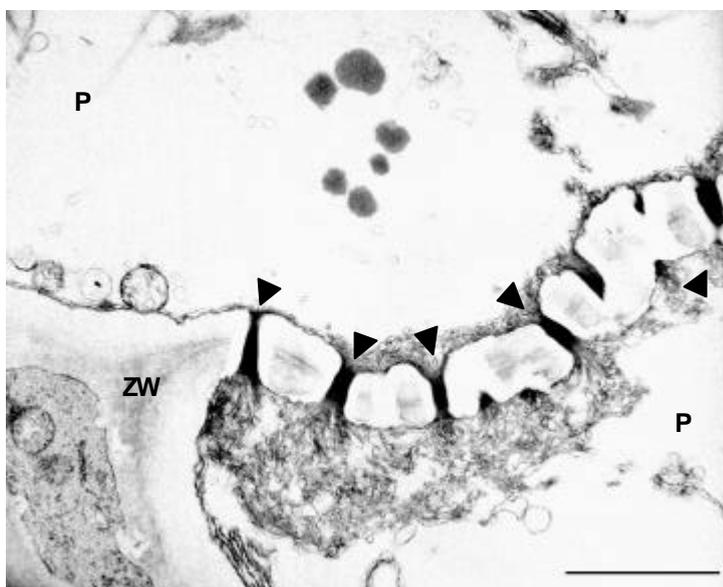
Anders liegen die Verhältnisse bei der Entwicklung von Siebelementen aus *Cuscuta*-Zellen die sich nicht in unmittelbarer Nachbarschaft zum Wirt befinden, z.B. im Haustorium. Diese Zellen besitzen den gleichen Differenzierungszustand und ihre Entwicklung erfolgt simultan. Abb. 3-47 zeigt zwei benachbarte Phloemelemente von *Cuscuta reflexa*, die über Siebporen miteinander verbunden sind.



**Abb. 3-46: Kontaktstelle zwischen einer Hyphenzelle von *Cuscuta reflexa* und einem Siebelement (von *Vicia faba* ?)**

*Cuscuta* spezifische Marker sind durch Pfeile gekennzeichnet.

W?=Wirtssiebelement, P=Parasiten-Siebelement, ZW=Zellwand, Ca=Callose, (A) bar=1,16  $\mu\text{m}$ , (B) bar=0,91  $\mu\text{m}$



**Abb. 3-47: Phloemelemente innerhalb des Haustoriums von *Cuscuta reflexa***

Zwei benachbarte Siebröhrenglieder von *Cuscuta reflexa* innerhalb des Haustorialbereiches, die über Siebporen miteinander in Verbindung stehen. Siebporen von P-Protein durchsetzt (▶).

P=Parasiten-Siebelement  
ZW=Zellwand

bar=2,30  $\mu\text{m}$

## 4 Diskussion

### 4.1 Etablierung der Wirt-Parasit-Systeme

Zwischen allen von uns verwendeten Wirtspflanzen, *Nicotiana tabacum*, *Vicia faba*, *Arabidopsis thaliana*, und den von der Stammkultur isolierten Achsen von *Cuscuta reflexa* bildeten sich innerhalb von 12 bis 14 Tagen kompatible Wirt-Parasit-Beziehungen aus. In den meisten Fällen erfolgte die Parasitierung der Wirtspflanze im sog. parallelen Induktionsmodus. Zu diesem Zweck wird der zur Haustorienbildung befähigte „kontaktreizbare Abschnitt“ der *Cuscuta*-Achse an *einer* Flanke des zu parasitierenden Wirtsorgans mit einem Klebeband befestigt. Dabei wird das unter natürlichen Bedingungen auftretende Winden unterdrückt (IHL & WIESE 2000, HAUPT 2001). Diese Methode bietet mehrere Vorteile: Die Haustorien sind nicht über den gesamten Umfang des parasitierten Wirtsorgans verteilt, sondern liegen in einer Reihe untereinander. Damit können bei der Aufarbeitung Parasiten- und Wirtsgewebe besser voneinander getrennt werden. Durch das Fixieren mit Klebeband wird der für die Ausbildung der ersten Haustorienstadien notwendige Druck über die gesamte kontaktreizbare Zone zum gleichen Zeitpunkt ausgeübt und damit eine annähernd simultane Entwicklung der Haustorien ausgelöst. HAUPT (2001) fand bei Untersuchungen des Saccharose-Transports in mit *Cuscuta reflexa* parasitierten isolierten Blättern von *Pelargonium zonale*, dass im parallelen Induktionsmodus der funktionelle Phloemanschluss durchschnittlich zwei Tage früher als im gewundenen erreicht wurde.

Die makroskopisch sichtbare Entwicklung der Haustorien verlief auf allen Wirtspflanzen nach dem gleichen Muster. Vier Tage nach Beginn der Parasitierung waren Prähaustorien zu beobachten. Dabei handelt es sich um saugnapfartige Gewebeanschwellungen der Parasitenachse („Saugfüßchen“), über die ein enger, zunächst äußerer Kontakt zur Wirtspflanze hergestellt wird. Durch eine vom Parasiten ausgeschiedene elektronendichte zementartige Substanz, die aus unveresterten Pektinen besteht, werden die Epidermen beider Partner fest miteinander verklebt (VAUGHN 2003).

Innerhalb der „Saugfüßchen“ dringt das Haustorium keilförmig in das Wirtsgewebe ein, wobei das Rindenparenchym des Parasiten papillenartig auswächst. Im apikalen Bereich des Haustorialkeils kommt es zur Aufgliederung in zahlreiche einzelne Hyphenstränge (Abb. 3-19). Diese sog. Suchhyphen breiten sich im Wirtsgewebe nach allen Seiten sowohl inter- als auch intrazellulär aus (Abb. 3-39).

Nach mechanischer Befestigung an der Wirtspflanze, von uns als Beginn der Parasitierung bezeichnet, zeigten die Achsen des Parasiten ein kontinuierliches Wachstum. An ihm war, nach Messungen in den Wirt-Parasit-Systemen *Vicia faba-Cuscuta reflexa* und *Arabidopsis thaliana-Cuscuta reflexa*, der 1 cm lange Spitzenbereich zu ca. 85 % beteiligt. Der unmittelbar anschließende, angeklebte haustorienbildende Abschnitt hatte dagegen nur einen Anteil von ca. 15 % am Gesamtzuwachs. Auch war das Wachstum dieses Abschnitts zeitlich begrenzt und konnte nur bis zum vierten Tag nach Beginn der Parasitierung beobachtet werden. Die Abschnitte hinter dem Haustorialstück zeigten kein Wachstum.

Prinzipiell gleiches Wachstumsverhalten wurde auch an *Cuscuta*-Achsen ohne Wirtskontakt beobachtet. Auch bei ihnen hatte der 1 cm lange apikale Abschnitt den größten Anteil am Wachstum (SCHULZ 2000, BIRSCHWILKS 2000). Nach 4 Tagen trat eine deutliche Stagnation des Wachstums auf, zum gleichen Zeitpunkt wurden die Anlagen der Prähaustorien sichtbar. Innerhalb der *Cuscuta*-Achse hatte sich durch die Wachstums- und Differenzierungsprozesse bei der Haustorienbildung ein zweiter *sink* entwickelt, der mit der wachsenden Spitze um die Assimilate konkurriert. Bei isoliert wachsenden Achsen konnte eine Wachstumsstagnation nicht beobachtet werden (SCHULZ 2000, BIRSCHWILKS 2000).

Ab dem achten Tag nimmt die Wachstumsgeschwindigkeit wieder zu und erreicht mit 4,1 cm/d wesentlich höhere Werte als in den ersten Tagen der Parasitierung. Das ist ein deutliches Indiz für einen funktionellen Leitbündelanschluss des Parasiten und die Versorgung mit Nährstoffen aus dem Wirt. Für *Cuscuta odorata* und *Cuscuta platyloba* erfolgte in Wirt-Parasit-Systemen mit *Arabidopsis thaliana* die Ausbildung des funktionellen Wirtskontakts bereits nach 5-7 Tagen. Das deckt sich mit Ergebnissen von IHL & MIERSCH (1996), die bei Parasitierung von *Lycopersicon esculentum* für *Cuscuta platyloba* und *Cuscuta odorata* ebenfalls eine schnellere Entwicklung der Haustorien als für *Cuscuta reflexa* fanden.

Obwohl *Cuscuta* in allen Wirt-Parasit-Systemen dominierender *sink* ist, hängt ihre Entwicklung vom Umfang der Stoffproduktion in der Wirtspflanze ab. So war das Wachstum von *Cuscuta reflexa* auf *Arabidopsis thaliana* wesentlich geringer als auf *Nicotiana tabacum*, *Vicia faba* und *Pelargonium zonale*.

Bei der luxurierenden Ernährung über eine Wirtspflanze werden im Parasiten nicht benötigte Kohlenhydrate als Stärke in den Amyloplasten gespeichert (SINGH ET AL 1968, MISRA ET AL 1970, BARCKHAUS & WEINERT 1974, BIRSCHWILKS 2000).

Bis zum Anschluss an die Leitgewebe des Wirtes sind die isolierten Achsen bei ihrem Wachstum und Stoffwechsel auf die Substanzen angewiesen, die zum Zeitpunkt der Isolierung von der Stammkultur in ihnen vorliegen. Bis zum vierten Tag der Haustorienentwicklung wurde eine deutliche Abnahme des Kohlenhydratgehaltes in den Achsen gemessen (Abb. 3-2). Diese erfolgt hauptsächlich auf Kosten der Stärke. Der Gehalt an Saccharose blieb weitgehend konstant und stieg in den ersten Tagen der Haustorienentwicklung sogar über den Gehalt in den Ausgangsachsen an (Tab. B im Anhang). Dieses Ergebnis unterstreicht die Bedeutung von Saccharose als Transportsubstanz für die Versorgung der wachsenden Spitzenabschnitte und das sich entwickelnde Haustorium mit Kohlenhydraten. Durch Berechnung des Anteils, den die einzelnen Achsenabschnitte am Gesamtgehalt der Achse während der Haustorienentwicklung besitzen, konnten wir zeigen, dass die Versorgung des Neuzuwachses in erster Linie auf Kosten der Abschnitte hinter dem neugebildeten Haustorium erfolgt. So sinken die prozentualen Anteile dieser Abschnitte am Stärkegehalt der Achse vom Beginn der Parasitierung bis zum achten Tag der Haustorienentwicklung von 61,5 % auf 15,7 %, am Saccharosegehalt von 71,2 % auf 22,1 %.

Alle *Cuscuta reflexa*-Achsen zeigten zwei Tage nach Beginn der Parasitierung ein deutliches Ergrünen des Neuzuwachses, das etwa bis zum sechsten Tag der Parasitierung anhielt. Die gleiche Erscheinung konnten wir auch an isoliert wachsenden Achsen ohne Wirtskontakt beobachten. Für sie konnte gezeigt werden, dass das Ergrünen sowohl mit einer Zunahme des Chlorophyll- und Carotinoidgehaltes als auch mit einer gesteigerten Photosyntheseaktivität, messbar durch einen Anstieg der CO<sub>2</sub>-Fixierung, der O<sub>2</sub>-Entwicklung und der Menge an Rubisco, verbunden war (BIRSCHWILKS 2000, BIRSCHWILKS ET AL 2001).

*Cuscuta reflexa* hat durch die parasitische Lebensweise die Fähigkeit zur Photosynthese nicht verloren (MACLEOD 1962, BACCARINI 1966, FER 1979, MACHADO & ZETSCHKE 1990, HIBBERD ET AL 1998, SHERMAN ET AL 1999, BIRSCHWILKS ET AL 2001). Bei einem Wachstum mit Wirtskontakt und ausreichender Versorgung mit Kohlenhydraten spielt sie jedoch keine Rolle.

Wird der Nährstoffstrom durch die Isolierung von der Wirtspflanze aber unterbrochen, reagiert *Cuscuta* mit einem Anstieg der Photosynthese. Der Substanzgewinn durch die Photosynthese ist sehr gering und spielt nach der Ausbildung des funktionellen Wirtskontaktes überhaupt keine Rolle mehr. Bei Brückeninfektionen war bei der Haustorienausbildung an der zweiten Wirtspflanze in keinem Fall ein Ergrünen des Neuzuwachses zu beobachten, da *Cuscuta* durch den Kontakt mit der ersten Wirtspflanze ausreichend mit Nährstoffen versorgt wurde. Bei isolierten Achsen konnte durch exogene Applikation von Saccharose das Ergrünen des Neuzuwachses und damit der Anstieg der Photosynthese im Parasiten verzögert werden (BIRSCHWILKS 2000).

## 4.2 Xylemtransport

In Wirt-Parasit-Systemen mit *Vicia faba* bzw. *Arabidopsis thaliana* als Wirtspflanze wurde der funktionelle Xylemanschluss zwischen beiden Partnern durch Applikation von Texas red Dextran an den Wirt mikroskopisch dargestellt. Der nach Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 543 nm rot fluoreszierende wasserlösliche Farbstoff hat eine molare Masse von 3 kDa und wird ausschließlich im Apoplasten transportiert. Er ist der Farbstoff der Wahl, um einen funktionellen Transport im Xylem darzustellen (ROBERTS ET AL 1997, OPARKA ET AL 1996b, HAUPT 2001, HAUGLAND 2002). In den Querschnitten durch die Haustorialregion war sein Transport von den Leitbündeln des Wirtes über das Haustorium in die Leitbündel des Parasiten als durchgängige rote Fluoreszenz sichtbar (Abb. 3-4 und 3-27). Innerhalb des Haustoriums bildet das Xylem einen zentralen Strang, der aus wenigen, relativ großlumigen Gefäßen mit verstärkten Wänden besteht (Abb. 3-15). Sie entstehen wie die Phloemelemente durch Differenzierung aus den Parenchymzellen des Haustorialkeiles (DÖRR 1996).

Die Versorgung des Parasiten mit Substanzen über das Xylem ist, wie unsere Untersuchungen zeigten, jedoch außerordentlich gering, was auf seine geringe Transpiration (FER ET AL 1987) als treibende Kraft für den Wassertransport im Xylem zurückzuführen ist. In *Cuscuta reflexa*-Achsen sind zwar wiederholt Spaltöffnungen beschrieben worden (UNGER 1840, ULOTH 1860,

KOCH 1874, SCHMUCKER 1959, PANT & BANERJI 1965), ihre Anzahl ist aber mit 1-2 pro mm<sup>2</sup> außerordentlich gering (SCHAFFNER 1979). Wir fanden bei lichtmikroskopischen Untersuchungen nur im jungen apikalen Spitzenbereich Stomata mit geschlossenen Spalten und stark vakuolisierten Schließzellen, was darauf hindeutet, dass sie in ihrer Öffnungsweite noch regulierbar sind (BIRSCHWILKS 2000). Im mittleren Achsenbereich sind sie zu extrafloralen Nektarien umgestaltet, durch die Saccharosetröpfchen ausgeschieden werden (SCHAFFNER 1979). Die in unseren Experimenten exogen an den Wirt applizierten ausschließlich im Xylem mobilen Xenobiotika Diuron und Atrazin (NEUMANN ET AL 1985) sowie das Schwermetall Cadmium gelangten nur zu sehr geringen Anteilen in die *Cuscuta*. Nach einer Versuchsdauer von 24 Stunden konnten unabhängig von der Versuchsanordnung (bewurzelte Wirt-Parasit-Systeme oder wurzellose Explantate) nur durchschnittlich 4 % der transportierten Verbindungen im Parasiten nachgewiesen werden. Auch bei Verlängerung der Applikationsdauer auf sechs Tage, wie bei den Translokationsuntersuchungen des Schwermetalls, wurden nur 10,1 % des aus der Wurzel austransportierten Cadmiums in *Cuscuta* gemessen.

Der Hauptanteil dieser Verbindungen lag im Parasiten stets im Haustorialstück, d.h. in unmittelbarer Nachbarschaft zum Wirt, vor. Bei Fehlen empfindlicher Methoden sind die geringen Substanzmengen, die über das Xylem in den Parasiten gelangen, nur schwer nachzuweisen. Das führte dazu, dass für einige Verbindungen, wie z.B. für Nicotin ein Transport aus *Nicotiana* in die *Cuscuta*-Achse ausgeschlossen wurde (WALZEL 1952). Durch Elektronenspray-Massenspektroskopie konnten wir jedoch eindeutig den Transport dieses in der Wurzel des Wirtes synthetisierten und ausschließlich im Xylem transportierten Alkaloids in den Parasiten nachweisen. CZYGAN ET AL (1988) fanden beim Wachstum von *C. reflexa* und *C. platyloba* auf verschiedenen Solanaceen alle in den Wurzeln der Wirtspflanzen synthetisierten Alkaloide (Berberin, Atropin, L-Hyoscyamin, Scopolamin), wenn auch in unterschiedlichen Konzentrationen, im Parasiten wieder, was zusammen mit unserem Nachweis des Nicotins gegen eine qualitative Selektivität beim Xylemtransfer spricht.

In unseren Versuchen konnte gezeigt werden, dass ambimobile Verbindungen, wie die nichtproteinogene  $\alpha$ -Aminoisobuttersäure (AIB) und das Herbizid Glyphosat, nach exogener Applikation sowohl über intakte Wurzelsysteme als auch über die offene Schnittfläche des Wirtes in sehr viel größeren Mengen als die xylemmobilen Verbindungen in den Parasiten gelangen und in ihm auch anders verteilt werden. Ihr Hauptanteil befindet sich in den wachsenden Abschnitten der *Cuscuta*-Achse. Der Transport dieser Substanzen in den Parasiten erfolgt hauptsächlich über das Phloem, was auch durch die Akkumulation dieser Verbindungen in den *sink*-Abschnitten deutlich wird. Der dazu notwendige Xylem-Phloem-Transfer findet nach unseren Ergebnissen bereits in der *Vicia*-Achse statt, da in beblätterten und blattlosen Versuchssystemen übereinstimmende Verteilungsmuster erhalten wurden. ESCHRICH (1966) wies mit der Aphidentchnik einen Phloem-Transport von wurzelapplizierter <sup>14</sup>C-Saccharose in *Vicia faba* nach. Bei Unterbrechung des Phloemstromes durch Dampfriegelung trat kein radioaktiv markierter Honigtau mehr auf. Für Aminosäuren, einschließlich AIB (DA SILVA & SHELP 1990), wurde wiederholt ein Xylem-Phloem-Transfer

nachgewiesen (VAN DIE 1963, GARDNER & PEEL 1971, JESCHKE & PATE 1991, JESCHKE & HARTUNG 2000).

JESCHKE ET AL (1994a, b) parasitierten *Lupinus albus* mit *Cuscuta reflexa* und bestimmten C- und N-Gehalte in ausgewählten Abschnitten des Wirtes und des Parasiten sowie im Phloem- und Xylemsaft. Aus den erhaltenen Werten berechneten sie ein Modell für Transportflüsse und die Verteilung von Kohlenstoff- und Stickstoffverbindungen zwischen Wirt und Parasit. Danach bezieht *Cuscuta* sowohl Stickstoff- als auch Kohlenstoffverbindungen zum größten Teil aus dem Phloem des Wirtes. Der über das Xylem importierte Anteil beträgt für N-Verbindungen lediglich 6,4 %, für C-Verbindungen nur 0,5 %. Das ist umso bemerkenswerter, da in dem von ihnen benutztem Wirt-Parasit-System der größte Teil der Stickstoffverbindungen in den Wurzelknöllchen der Wirtspflanze synthetisiert und im Xylem in die oberirdischen Abschnitte transportiert wird. Phloem- und Xylemsaft-Analysen zeigten unter dem Einfluss von *Cuscuta* eine deutliche Erhöhung des N-Gehaltes im Phloemsaft gegenüber den nicht parasitierten Kontrollpflanzen. Offensichtlich wird der auch in nicht parasitierten Lupinenpflanzen vorhandene Xylem-Phloem-Transfer (LAYZELL ET AL 1981, PATE 1986) unter dem Einfluss des neu etablierten sinks *Cuscuta* verstärkt. Auch durch sich entwickelnde Früchte kommt es zu einer Erhöhung des Xylem-Phloem-Transfers (PATE 1984).

JESCHKE ET AL (1994b) gehen bei ihrem Modell davon aus, dass der Stoffaustausch zwischen Phloem und Xylem nicht in den Blättern sondern bereits in den Internodien der Wirtspflanze stattfindet, was auch unsere Ergebnisse klar zeigen. Auch in nicht parasitierten Lupinenpflanzen erfolgt nach Untersuchungen von LAYZELL ET AL (1981) in diesen Abschnitten ein Austausch der Stickstoffverbindungen zwischen den beiden Leitsystemen, bei dem die Xylemparenchymzellen eine entscheidende Rolle spielen (KUO ET AL 1980, LAYZELL ET AL 1981). Für *Arabidopsis* wird eine Beteiligung des Aminosäuretransporters AAP2 am Xylem-Phloem-Transfer im Stengel diskutiert. Das Protein wird im Phloem exprimiert und soll auch am *retrieval* der Aminosäuren entlang des *path* beteiligt sein (HIRNER ET AL 1998).

Wir führten unsere Untersuchungen zur Xylemtranslokation sowohl an bewurzelten Pflanzen als auch an wurzellosen Explantaten durch. Bei den Explantaten erfolgte die Applikation der Verbindungen über die untere Schnittfläche der Wirtspflanze. Für beide Versuchsanordnungen erhielten wir übereinstimmende Ergebnisse, die prozentualen Anteile an transportiertem Glyphosat und transportierter AIB waren in den wurzellosen Explantaten jedoch höher als in den Experimenten mit bewurzelten Pflanzen. Bei Applikation über die Schnittfläche findet zusätzlich zum bereits angesprochenen Xylem-Phloem-Transfer eine direkte Aufnahme von AIB und Glyphosat aus dem bei der Fütterung infiltrierten Apoplasten statt. Eine solche Aufnahme mit nachfolgendem Transport im Phloem konnte für phloem- und ambimobile Xenobiotika auch an isolierten Infloreszenzachsen von *Yucca* (NEUMANN ET AL 1985), für das Herbizid Glufosinat und für AIB an abgeschnittenen Sprossen von *Glycine spec.* gezeigt werden (SHELP ET AL 1992).

Mit der aus unseren Experimenten abgeleiteten Schlussfolgerung, dass *Cuscuta* die Hauptmenge der über die Wurzel aufgenommenen Substanzen nach einem Xylem-Phloem-

Transfer über das Phloem bezieht, stimmt auch die von WALLACE ET AL. (1978), MALIK & SINGH (1979) sowie von SARIC ET AL. (1991) ermittelte Verteilung von Mineralstoffen in ausgewählten Abschnitten von Wirt und Parasit überein. Sie zeigt einen engen Zusammenhang mit der Mobilität der Mineralstoffe im Phloem. Die sehr gut im Phloem mobilen Ionen  $K^+$ ,  $Mg^{2+}$  und  $PO_4^{3-}$  (ZIEGLER 1975) liegen in hohen, die Werte des Wirtes übersteigenden Konzentrationen im Parasiten vor und befinden sich bevorzugt in der wachsenden *sink*-Region. Die Gehalte von  $Fe^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  und  $Cu^{2+}$ , von ZIEGLER (1975) als Mineralien mit mittlerer (intermediärer) Phloemmobilität eingestuft, entsprechen den Konzentrationen im Wirt oder liegen geringfügig darunter. Das Gleiche gilt für Bor, das in der Aufstellung von ZIEGLER (1975) noch als phloemimmobil galt, für das aber in neueren Arbeiten ebenfalls ein Xylem-Phloem-Transfer nachgewiesen werden konnte (SHELP ET AL. 1998). Die Konzentration des im Phloem immobilen  $Ca^{2+}$  (BUKOVAC & WITTEW 1957, ZIEGLER 1975) lag bei allen Analysen stets wesentlich unter der in der Wirtspflanze. Innerhalb der Parasitenachse besitzt das Haustorialstück den größten Gehalt an  $Ca^{2+}$ . Das entspricht der in unseren Experimenten ermittelten Verteilung von Atrazin, Diuron und Cadmium (Abb. 3-7B und D sowie Abb. 3-8A vergl. Abschn. 1+4).

### 4.3 Phloemtransport

Der Stofftransfer zwischen Wirt und Parasit über das Phloem ist wesentlich intensiver als über das Xylem. Das entspricht auch den anatomischen Verhältnissen. Die im Querschnitt elliptischen Haustorien besitzen konzentrische Leitbündel mit zentralen großlumigen Xylemelementen, die allseitig von zahlreichen Phloemelementen aus Siebröhren und Geleitzellen umgeben sind. Die Anzahl der Phloemelemente ist wesentlich größer als die der Xylemelemente (Abb. 3-15). DÖRR (1990) zählte in einem Querschnitt durch die Leitbündel des Haustoriums von *Cuscuta odorata* 20 Xylem- und 120 Phloemelemente.

Im Mittelpunkt unserer Untersuchungen zum Phloemtransport stand die Klärung der Frage, ob der Transfer der Substanzen aus dem Phloem des Wirtes in den Parasiten apoplastisch oder symplastisch erfolgt.

Die Experimente wurden an Explantaten durchgeführt. Dabei wurden die für mindestens 14 Tage mit *Cuscuta reflexa* parasitierten *Vicia*-Pflanzen stark reduziert. Die Explantate bestanden nur noch aus dem mit *Cuscuta* parasitierten Internodium und einem Blatt oberhalb der Parasitierung, das an der gleichen Flanke wie der Parasit inseriert war (Abb. 3-11). Alle übrigen Blätter und die Wurzeln wurden entfernt. Unmittelbar nach der Präparation wurde durch Einstellen der Explantate mit der unteren Schnittflächen für 30 Minuten in eine Lösung von 10 mM EDTA/ 10 mM MES-NaOH (pH 5) ein Verschluss der Siebröhren und damit eine Unterbrechung des Phloemstromes verhindert (KING & ZEEVART 1974). Während der Versuche standen die Internodien in einer EDTA-freien Pufferlösung von 10 mM MES-NaOH (pH 5). In den so präparierten Wirt-Parasit-Systemen liegen im Gegensatz zu

vollständigen Wirtspflanzen übersichtlichere *source-sink*-Beziehungen und ein, in nur einer Richtung verlaufender Phloemstrom vor (Abb. 3-11). Während einer Versuchsdauer von 3 Stunden wurden ca. 73 % der auf das *Vicia*-Blatt aufgetropften  $^3\text{H}$ -Saccharose aus dem Blatt austransportiert, ca. 24 % gelangten bis in die Pufferlösung. Die Verteilung innerhalb des Wirt-Parasit-Systems wird deutlich durch *Cuscuta* als *sink* bestimmt. So enthielt der parasitierte *Vicia*-Stengelabschnitt mit den Haustorien 41 % der transportierten Verbindungen, die Abschnitte ober- und unterhalb der Parasitierung dagegen nur 11 % bzw. 12 %. In den Parasiten gelangten 36 % der transportierten Verbindungen.

In weiteren Experimenten verglichen wir den Transport von Saccharose mit dem von zwei Xenobiotika, MCPA und Glyphosat. Dabei sollte geprüft werden, ob *Cuscuta* in der Lage ist, aus den im Phloem transportierten Verbindungen auszuwählen. Bei einem apoplastischen Transfer wäre eine Selektivität des Transports zu erwarten.

Von beiden Verbindungen ist bekannt, dass sie nach Beladung in den Siebröhren-Geleitzellen-Komplex von den *source*-Blättern gemeinsam mit den Assimilaten im Phloem zu den *sinks* transportiert werden (MÜLLER 1969, GOUGLER & GEIGER 1981).

Da Saccharose  $^3\text{H}$ -markiert und das Xenobiotikum  $^{14}\text{C}$ -markiert als Substanzgemisch an das *source*-Blatt appliziert wurden, konnte der Transport beider Verbindungen in *derselben* Pflanze unter völlig identischen physiologischen und äußeren Bedingungen (Temperatur, Licht, Luftfeuchtigkeit) bestimmt werden. Mit dieser Versuchsanordnung konnte auch überprüft werden, ob durch die Xenobiotika eine Beeinflussung des Assimilatstromes, wie sie für Glyphosat beschrieben wurde, erfolgt (GOUGLER & GEIGER 1984). Obwohl die Konzentrationen der Xenobiotika in den Applikationslösungen mit 1 mM relativ hoch waren, wurden in Experimenten mit und ohne Xenobiotika-Applikation keine Unterschiede in den Translokationsraten und Verteilungsmustern von Saccharose festgestellt (Abb. 3-12).

In beiden Versuchsreihen, d.h. nach Applikation der Substanzgemische  $^3\text{H}$ -Saccharose/ $^{14}\text{C}$ -MCPA sowie  $^3\text{H}$ -Saccharose/ $^{14}\text{C}$ -Glyphosat, wurden für Saccharose und Xenobiotikum völlig identische Muster der Verteilung sowohl zwischen Wirt und Parasit als auch innerhalb der Parasitenachse festgestellt (Abb. 3-12). Diese Ergebnisse sprechen ganz klar für einen symplastischen und gegen einen apoplastischen Transfer zwischen Wirt und Parasit.

Beim apoplastischen Transfer wären wegen der erforderlichen zwei Membranpassagen, dem Austritt der Verbindungen aus den Siebröhren des Wirtes in den gemeinsamen Apoplasten und die Aufnahme in die Kontakthyphe des Parasiten, deutliche Unterschiede zwischen den Anteilen von Saccharose und Xenobiotikum, die aus dem Wirt in den Parasiten gelangen, zu erwarten. Sie sind insbesondere durch die unterschiedlichen Mechanismen bei der Aufnahme aus dem gemeinsamen Apoplasten in den Parasiten bedingt. Für Saccharose ist eine Aufnahme über spezifische Carrier anzunehmen, für die Xenobiotika eine Diffusion. Bei Aufnahmeuntersuchungen mit isolierten Leitbündeln von *Cyclamen persicum* wurden für die Xenobiotika MCPA und Glyphosat auch deutliche Unterschiede in den Permeationskonstanten gefunden (GRIMM ET AL. 1995). Völlig unklar ist nach bisherigen Untersuchungen, wie die Freisetzung der Verbindungen aus dem Phloem des Wirtes an der Kontaktstelle des Haustoriums erfolgen soll. Einzige experimentelle Hinweise für einen

solchen von *Cuscuta* induzierten Efflux sind die von WOLSWINKEL (1974b) und von WOLSWINKEL & AMERLAAN (1983) für das Wirt-Parasit-System *Vicia faba-Cuscuta reflexa* beschriebenen Auswaschexperimente. Sie sind jedoch wegen der ungewöhnlich langen Auswaschzeiten von mehreren Stunden, die auch zu einer Freisetzung von Substanzen aus dem Symplasten führen können, methodisch umstritten (SAMODELKIN 1990). Nach Ansicht von WOLSWINKEL & AMERLAAN (1983) soll der Efflux der Saccharose über spezifische Carrier erfolgen und metabolisch kontrolliert werden. Denkbar wäre bei einem passivem Efflux auch eine Hemmung der für die Wiederaufnahme in das Phloem verantwortlichen Carrier. Schwer vorstellbar ist dagegen der Efflux der Xenobiotika. Aufgrund ihrer physikochemischen Eigenschaften zeigen beide Verbindungen eine große Retention im Phloem. Sie ist auch Voraussetzung dafür, dass sie überhaupt in diesem Ferntransportsystem über weite Strecken mobil sind (NEUMANN ET AL. 1985). MCPA ist im alkalischen Phloemsaft zu 99,9 % in hydrophile Anionen mit einem Verteilungskoeffizienten von  $\log K_{OW} = -0,74$  dissoziiert (GRIMM ET AL. 1995), die nach dem Prinzip einer Ionenfalle in den Siebröhren zurückgehalten werden. Die Retention des sowohl bei pH 5 als auch bei pH 8 sehr wasserlöslichen Glyphosats, charakterisiert durch einen Verteilungskoeffizienten von  $\log K_{OW} = -0,92$  (NEUMANN ET AL. 1985), erfolgt nach einem *intermediate permeability* Mechanismus (TYREE ET AL. 1979).

Ein Efflux beider Verbindungen kann nur durch Diffusion erfolgen. Carrier, die, wie im Fall von Saccharose, die Substanzen wieder in das Phloem zurückpumpen, sind nicht zu erwarten. Für MCPA als schwache Säure wäre eine Erhöhung des Efflux durch eine lokale Erhöhung des pH-Wertes im Apoplasten und eine dadurch bedingte Veränderung des Dissoziationsgleichgewichtes denkbar. Für einen solchen pH-*shift* gibt es jedoch bisher keinen Hinweis. Der Efflux von Glyphosat, dessen Verteilungskoeffizienten sich bei pH 5 und pH 8 nicht unterscheiden (NEUMANN ET AL. 1985) würde dadurch nicht beeinflusst. Wir haben aber festgestellt, dass für beide Xenobiotika über die Kontaktstelle vergleichbare Anteile an transportierten Substanzen in den Parasiten gelangen (Abb. 3-12).

Unsere Experimente bestätigen die Ergebnisse von HAUPT (2001), die im Wirt-Parasit-System *Pelargonium zonale-Cuscuta reflexa* nach simultaner Applikation von Saccharose und einer breiten Palette biotischer und xenobiotischer Verbindungen ebenfalls einen nicht selektiven Transport vom Wirt in den Parasiten nachweisen konnte.

Durch geeignete Fluoreszenzfarbstoffe können symplastische Verbindungen sowohl zwischen den Zellen einer Pflanze als auch zwischen Zellen unterschiedlicher Arten, wie sie bei Pfropfungen vorliegen, mikroskopisch sichtbar gemacht werden (SCHÖNING & KOLLMANN 1995, GOLECKI ET AL. 1998). Die Farbstoffe können auch zur Markierung des Phloemtransports benutzt werden, da sie nach exogener Applikation an die *source*-Blätter einer Pflanze in den Siebröhren-Geleitzellen-Komplex aufgenommen und gemeinsam mit den Assimilaten zu den *sinks* transportiert werden (WANG ET AL. 1994, WANG & FISCHER 1994, DUCKETT ET AL. 1994, OPARKA ET AL. 1994, 1995, ROBERTS ET AL. 1997, HAUPT ET AL. 2001b). Dabei zeigen sie keinerlei störende oder toxische Einflüsse auf den Phloemstrom. Der am häufigsten als Marker für einen symplastischen Zell-Zell-Transport verwendete Fluoreszenzfarbstoff ist 5(6)-Carboxyfluorescein (CF). Durch zwei Carboxylgruppen am

Benzolring besitzt die Verbindung gegenüber dem in früheren Experimenten häufig benutzten Fluorescein (SCHUMACHER 1933, 1934) im schwach alkalischen Symplasten eine wesentlich stärkere Dissoziation und damit auch eine größere Hydrophilie. Entsprechend der pKa-Werte von 3,3; 4,65 und 6,98 liegen von CF im pH-Bereich zwischen 6,3 und 7,3 nur noch 0,01-0,1 % der Verbindung undissoziiert vor (WRIGHT ET AL 1996). Während Fluorescein mit pKa-Werten von 4,4 und 6,7 (MARTIN & LINDQUIST 1976) im Phloem noch zu einem gewissen Umfang als undissoziiertes membranpermeables Molekül vorliegt und damit auch entlang des *path* in den Apoplasten austreten kann, verbleiben die hydrophilen Anionen von 5(6)-Carboxyfluorescein stets im Phloem bzw. beim Transport von Zelle zu Zelle im Symplasten (OPARKA 1991, GRIGNON ET AL 1989, KNOBLAUCH & VAN BEL 1998). Um die für den Nachweis im Fluoreszenzmikroskop notwendigen Konzentrationen des Farbstoffes in den Zellen zu erreichen, wird dieser als lipophiler, nicht fluoreszierender Ester mit einem Verteilungskoeffizienten von  $\log K_{OW}=1,3$  appliziert. Seine Aufnahme ist wesentlich besser als die der Säure ( $\log K_{OW}=-1,9$ ), die zudem bei pH 5 im Apoplasten bereits zu einem wesentlichen Prozentsatz dissoziiert ist (WRIGHT ET AL 1996). Durch unspezifische Esterasen werden die Ester nach ihrer Aufnahme in die Zelle gespalten. Ein weiterer als symplastischer Transportmarker eingesetzter Farbstoff ist 8-Hydroxypyren-1,3,6-trisulfonsäure (HPTS). Mit den drei Sulfonsäuregruppen, die im alkalischen Bereich des Symplasten dissoziiert vorliegenden, ist die Verbindung noch hydrophiler als CF ( $\log K_{OW}=-10,1$  WRIGHT ET AL 1996). Auch HPTS wird als lipophiler Ester, 8-Acetoxypyren-1,3,6-trisulfonsäure (HPTSA), appliziert. Die Verteilung des Fluoreszenzfarbstoffes im Phloem erfolgt nach dem gleichen Muster wie die der Assimilate (WRIGHT & OPARKA 1996).

Wir applizierten beide Farbstoffe als Ester an *source*-Blätter von mit *Cuscuta* parasitierten *Vicia*-Pflanzen. Applikationsort und Ort des Übertritts in den Parasiten waren 10-15 cm voneinander entfernt. Damit konnte ausgeschlossen werden, dass die Ester innerhalb der von uns benutzten Versuchszeiten ungespalten im Apoplasten bis zur Kontaktstelle zwischen Wirt und Parasit gelangen und dort direkt aus dem Apoplasten in *Cuscuta* aufgenommen werden.

Bereits nach 3 Stunden war im Fluoreszenzmikroskop ein Übertritt beider Farbstoffe aus dem Phloem des Wirtes über das Phloem des Haustoriums in das Phloem der Parasitenachse deutlich zu erkennen (Abb. 3-14). Dabei wiesen die durch *Cuscuta* parasitierten Leitbündel gegenüber den nicht parasitierten eine wesentlich stärkere Fluoreszenz auf, was auf einen erhöhten Transport über diese Bündel hindeutet. Mit diesen Bildern werden die aus den Ergebnissen der Translokationsversuche abgeleiteten Vorstellungen von einem symplastischen Stofftransfer zwischen beiden Partnern auf zellulärer Ebene eindrucksvoll bestätigt. Auch in den Wirt-Parasit-Systemen *Arabidopsis thaliana*-*Cuscuta reflexa* (Abb. 3-20) und *Pelargonium zonale*-*Cuscuta reflexa* (BIRSCHWILKS, Ergebnis nicht dargestellt) konnte nach einer Versuchsdauer von 3 Stunden ein Transport von CF aus der Wirtspflanze in den Parasiten sichtbar gemacht werden. HAUPT (2001) zeigte einen Übertritt von Fluoreszenzfarbstoffen aus *Nicotiana benthamiana* in *Cuscuta reflexa*. Damit liegen aus Experimenten mit Wirtspflanzen aus vier unterschiedlichen Familien (Fabaceae,

Brassicaceae, Geraniaceae, Solanaceae) übereinstimmende Ergebnisse über die symplastische Natur der Phloemverbindungen zwischen Wirt und *Cuscuta reflexa* vor.

Obwohl Siebelemente im ausdifferenzierten Zustand keinen Zellkern und keine Ribosomen besitzen (SJÖLUND 1997, KNOBLAUCH & VAN BEL 1998) und damit auch nicht mehr zur Proteinsynthese fähig sind, wurde im Phloemsaft eine große Anzahl (>200) unterschiedlichster Proteine nachgewiesen (FISHER ET AL 1992, NAKAMURA ET AL 1993, SAKUTH ET AL 1993). Die P-Proteine von *Cucurbita maxima* PP1 und PP2 sind dabei mengenmäßig am bedeutendsten (SMITH ET AL 1987, BOSTWICK ET AL 1992, CLARK ET AL 1997). Eine Vielzahl der im Phloem transportierten Proteine ist charakterisiert worden (THOMPSON & SCHULZ 1999, KEHR ET AL 1999, HAYASHI ET AL 2000, OPARKA & SANTA CRUZ 2000). So wurden im Phloemsaft u.a. Cystatin (BALACHANDRAN ET AL 1997), Glutaredoxin (SZEDERKENYI ET AL 1997), Profilin (SCHOBERT ET AL 2000), Thioredoxin h (ISHIWATARI ET AL 1995, 1998), Ubiquitin (SCHOBERT ET AL 1995, 1998), Saccharose-Transporter SUT1 (KÜHN ET AL 1997) und CmPP16 bzw. CmPP36 (XOCONOSTLE-CAZARES ET AL 1999 BZW. 2000) nachgewiesen. CmPP16 kann RNA binden und so, wie das virale *movement protein*, deren Transport zwischen Mesophyllzellen vermitteln.

Die Proteine besitzen Molmassen zwischen 10 und 200 kDa. Ihre Synthese erfolgt in den Geleitzellen. Die verzweigten Plasmodesmen zwischen Geleitzellen und Siebelementen besitzen eine Ausschlussgröße zwischen 10 und 40 kDa, so dass Proteine dieser Größe ungehindert aus den Geleitzellen in die Siebelemente gelangen können (KEMPERS ET AL 1993, KEMPERS & VAN BEL 1997). Thioredoxin h, Cystatin, Glutaredoxin, PP1, PP2 und CmPP16 können die Ausschlussgröße von Plasmodesmen erhöhen und damit ihren eigenen Transport sowie den von mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelten Dextranen ermöglichen (BALACHANDRAN ET AL 1997, THOMPSON & SCHULZ 1999).

Besondere Bedeutung für die Untersuchung des Proteintransports besitzt das grün-fluoreszierende Protein (GFP), dessen Transportweg in der Pflanze durch seine Fluoreszenz verfolgt werden kann. IMLAU ET AL (1999) gelang seine Synthese unter Kontrolle des AtSUC2 Promotors in den Geleitzellen transgener Pflanzen von *Arabidopsis thaliana* und *Nicotiana tabacum*. Wie die pflanzeigenen Proteine gelangt dieses fremde 27 kDa große Protein über Plasmodesmen in die Siebelemente und wird anschließend mit den Assimilaten zu den *sinks*, junge Blätter und sich entwickelnde Blüten, transportiert und dort entladen (IMLAU ET AL 1999, OPARKA ET AL 1999). Aufgrund der Molekülgröße kann die Entladung nur über Plasmodesmen erfolgen. Auch in Pfropfungsexperimenten mit transgenen und Wildtyppflanzen von *Nicotiana tabacum* konnte ein Phloemtransport von GFP nachgewiesen werden (IMLAU ET AL 1999).

Wir parasitierten transgene AtSUC2-GFP-Pflanzen von *Arabidopsis thaliana* mit *Cuscuta reflexa*, *Cuscuta odorata* und *Cuscuta platyloba*. Nach einer Parasitierungsdauer von mindestens 14 Tagen wurden Handschnitte durch die Haustorialregion angefertigt und mit dem konfokalen *laser scanning* Mikroskop ausgewertet. Dabei konnte für alle drei *Cuscuta*-Arten gezeigt werden, dass GFP aus den Siebröhren des Wirtes direkt in das Phloem des

Parasiten übertritt und anschließend im Phloem der *Cuscuta*-Achse zu den *sinks* transportiert wird (Abb. 3-22 und Abb. 3-23). Wie in den Versuchen mit Carboxyfluorescein konnte auch für GFP in den von *Cuscuta* parasitierten Bündeln des Wirtes eine wesentlich stärkere Fluoreszenz als in den nicht parasitierten Bündeln beobachtet werden. An nicht parasitierten Bündeln war auch kein Austritt des Proteins in das umgebende Wirtsgewebe zu erkennen. Die Größe des Proteins lässt nur einen symplastischen Übertritt zwischen den beiden Leitsystemen zu.

Der Nachweis des GFP-Transportes aus *Arabidopsis thaliana* in drei unterschiedliche *Cuscuta*-Arten spricht eindeutig gegen die von CHRISTENSEN ET AL (2003) vertretene Auffassung, dass der von HAUPT ET AL (2001a) und auch von uns in dieser Arbeit nachgewiesene GFP-Transfer zwischen AtSUC2-GFP-Tabak und *Cuscuta reflexa* (Abb. 3-24) eine, nur für diese Wirt-Parasit-Kombination spezifische Erscheinung darstellt und nicht zu verallgemeinern ist.

In einer zweiten Versuchsreihe wurden transgene *Arabidopsis*-Pflanzen, die eine Fusion von GFP mit Ubiquitin (35,5 kDa) in den Geleitzellen exprimieren, mit den drei *Cuscuta*-Arten parasitiert. Das Protein wird wie GFP mit dem Assimilatstrom aus den *source*-Blättern in die Blütendstandsachsen transportiert.

Wie bei den GFP-Pflanzen zeigten die Querschnitte durch die parasitierten Leitbündel der GFP-Ubiquitin-Pflanzen ebenfalls eine wesentlich stärkere Fluoreszenz als die nicht parasitierten Bündel. Wir haben über 400 Wirt-Parasit-Systeme aufgearbeitet und die Parasitierungsdauer bis auf 30 Tage ausgedehnt, in keinem Fall konnte jedoch ein Übertritt des Proteins aus den Leitbündeln des Wirtes in den Parasiten beobachtet werden. Dass aber ein funktioneller Kontakt zwischen Wirt und Parasit bestand, über den ein Assimilattransport erfolgte, konnte durch Translokation von Saccharose aus dem Wirt in den Parasiten gezeigt werden (Tab. 3-13). Durch den ungehinderten Transport von CF (Abb. 3-26) wurde auch das Vorhandensein der durchgehenden funktionellen symplastischen Verbindung zwischen beiden Partnern nachgewiesen.

So lassen die Ergebnisse nur den Schluss zu, dass die Ausschlussgröße der plasmatischen Verbindungen zwischen dem Phloem von *Arabidopsis* und dem Phloem von *Cuscuta* im untersuchten Entwicklungsstadium kleiner als 35,5 kDa ist.

Auch SAUER und Mitarbeiter (persönliche Mitteilung) konnten in den transgenen *Arabidopsis*-Pflanzen keine Entladung des GFP-Ubiquitin in den *sinks* beobachten, was ebenfalls auf eine Ausschlussgröße <35,5 kDa für die Plasmodesmen in diesen Geweben hindeutet.

Auch die Proteine PP1 (96 kDa) und PP2 (48 kDa), die gut im Phloem von *Cucurbita maxima* transportiert werden (GOLECKI ET AL 1999, THOMPSON & SCHULZ 1999) und auch in heteroplastischen Pfropfungen einen ungehinderten Transport zwischen Reis und Unterlage zeigen (GOLECKI ET AL 1998), werden nicht aus dem Phloem entladen (CLARK ET AL 1997, DANNENHOFFER ET AL 1997).

Die molaren Massen der Proteine sagen nichts über ihre Form aus, die beim Transport durch die Plasmodesmen sicher auch eine Rolle spielt. Das GFP-Molekül z.B. ist ein Zylinder mit einem Durchmesser von 2,4 nm und einer Länge von 4,2 nm (ORMÖ ET AL 1996, YANG ET AL. 1996). Über die Form und räumliche Ausdehnung von GFP-Ubiquitin ist bisher jedoch nichts bekannt.

#### 4.4 Brückenversuche

Seit zu Beginn der vierziger Jahre BENNETT (1940) und JOHNSON (1941a, b) von ersten gelungenen Versuchen, pflanzliche Viren durch *Cuscuta* zu übertragen, berichtet, ist *Cuscuta* für die pflanzliche Virusforschung bedeutend geworden. Bisher wurden Untersuchungen mit mehr als 50 Virusarten durchgeführt und verschiedene *Cuscuta*-Arten auf ihre Eignung als Virusüberträger geprüft (BENNETT 1944a, b, 1956, SCHMELZER 1956, HOSFORD 1967). Für *Cuscuta reflexa* liegen bisher nur wenige Angaben in der Literatur vor. HOSFORD (1967) beschreibt eine Übertragung des *raspberry mosaic complex* (Himbeermosaikvirus) zwischen zwei Himbeerpflanzen, HAUPT (2001) konnte durch molekularbiologische Methoden eine erfolgreiche Übertragung des Potexvirus PVX durch *Cuscuta reflexa* zwischen zwei Pflanzen von *Nicotiana benthamiana* nachweisen.

Da die systemische Ausbreitung von Viren ihren symplastischen Transport von Zelle zu Zelle und zwischen *source* und *sink* einen Transport gemeinsam mit den Assimilaten im Phloem erfordert, sind Translokationsexperimente mit Viren neben Untersuchungen zum GFP-Transport eine weitere exzellente experimentelle Möglichkeit, um Aussagen über die Natur der zellulären Verbindungen zwischen Wirt und Parasit zu machen.

Wir untersuchten im Wirt-Parasit-System *Nicotiana tabacum* SNN-*Cuscuta reflexa* den Transport des *potato virus Y*, Stamm-N (PVY<sup>N</sup>), der zu den Potyviren gehört. Die Gattung ist mit ca. 180 Arten die größte innerhalb der Pflanzenviren (SHUKLA ET AL 1994). Ihre Vertreter verursachen Schäden an einem breiten Spektrum von Wirtspflanzen (>30 Familien) und werden durch Blattläuse nicht-persistent, das heißt nur für wenige Minuten nach dem Einstich in eine virusinfizierte Pflanze, durch die Mundwerkzeuge der Insekten übertragen, einige Arten sind auch durch Samen übertragbar (JOHANSEN ET AL 1994, SHUKLA ET AL 1994).

Das Genom des Potyvirus besteht aus einem einzelsträngigen (+) RNA Molekül (REVERS ET AL. 1999) und codiert für einen einzigen offenen Leserahmen (ORF), ein Polyprotein, das von drei viruscodierten Proteasen in funktionelle Proteine prozessiert wird (RIECHMANN ET AL 1992). An der Replikation sind wahrscheinlich verschiedene viruscodierte Proteine beteiligt (REVERS ET AL 1999). Das Hüllprotein (*coat protein*) ist das einzige Strukturprotein, das von der genomischen RNA codiert wird. Ein Viruspartikel wird aus der RNA und ca. 2000 Einheiten des Hüllproteins gebildet (MATTHEWS 1991)

Eine systemische Infektion der Pflanze erfolgt nur, wenn der Virus in der Lage ist, sich nach Vermehrung in einer Zelle in der ganzen Pflanze auszubreiten. Das erfordert zunächst einen

Transport des Virus von Zelle zu Zelle. Dazu muss die Ausschlussgröße der Plasmodesmen von ca. 1 kDa zwischen den Mesophyllzellen vergrößert werden (GOODWIN 1983, TERRY & ROBARDS 1987, LUCAS & GILBERTSON 1994). Diese Funktion übernimmt, z.B. beim Tabakmosaik Virus (TMV), ein von den Viren synthetisiertes spezielles Bewegungsprotein (*movement protein*, MP), bei den Potexviren, zu denen der von HAUPT (2001) benutzte PVX gehört, eine Reihe verschiedener Bewegungsproteine, die vom „triple gene block“ codiert werden und unter Beteiligung des *capsid proteins* das Virusgenom durch die Plasmodesmen transportieren. Der durch die MP's vermittelte Transport von Viren durch Plasmodesmen beinhaltet mehrere Prozesse, die Interaktionen der Bewegungsproteine mit anderen Virusproteinen und pflanzlichen Wirtsfaktoren umfassen (LAZAROWITZ 1999, LAZAROWITZ & BEACHY 1999, NELSON & VAN BEL 1998).

Für Potyviren sind die Vorgänge beim Zell-Zell-Transport noch nicht völlig geklärt (REVERS ET AL. 1999, URQUQUI-INCHIMA ET AL. 2000, KELLMANN 2001). Sie kodieren kein spezielles *movement protein*, an ihrer Ausbreitung sind das *capsid protein* (CP) sowie drei weitere Proteine (*viral genom-linked protein* (Vpg), *helper-component proteinase* (HC-Pro), *cylindrical inclusion protein* (CI)) beteiligt. Dass das CP mit Plasmodesmen interagiert und eine Erweiterung der plasmodesmalen Ausschlussgröße vermittelt, konnte von ROJAS ET AL. (1997) gezeigt werden.

Der Kurzstreckentransport des Virus beginnt in den meisten Fällen in einer mechanisch infizierten Epidermiszelle und setzt sich über die Mesophyllzellen zu den Bündelscheiden und dem Leitbündelparenchym bis zum Siebröhren-Geleitzellen-Komplex in den *minor veins* fort.

Der Übertritt der Viren in den Siebröhren-Geleitzellen-Komplex, die Beladung der Transportbahnen des Phloems, erfordert ebenfalls Plasmodesmen zu den umgebenden Zellen. Bei apoplastischen Beladern sind diese jedoch nur in sehr geringer Anzahl oder überhaupt nicht vorhanden (GAMALEI 1989, VAN BEL 1993, NELSON & VAN BEL 1998).

Die entscheidende Barriere stellt der Übertritt des Virus aus den Bündelscheiden- in die Phloemparenchymzellen und/oder Geleitzellen dar (DING ET AL. 1996). Nach Untersuchungen von DING ET AL. (1998) an *Nicotiana spec.* gelangen TMV und PVY aus den Bündelscheidenzellen über das Phloemparenchym in die Geleitzellen. Es wird auch diskutiert, dass die Viren direkt an den feinen Enden der *minor veins* (ESAU 1977) in die Siebelemente eintreten können (DING ET AL. 1998), bzw. bereits in unreife, noch mit den umgebenden Zellen über Plasmodesmen verbundene Phloemelemente aufgenommen werden (TURGEON 1989), sich in den Geleitzellen vermehren, über Plasmodesmen in die Siebelemente übertreten und nach *source-sink-transition* austransportiert werden (ROBERTS ET AL. 1997, OPARKA & SANTA CRUZ 2000). Im Phloem erfolgt der Transport der Viren gemeinsam mit den Assimilaten zu den *sinks* (LEISNER & TURGEON 1983, CARRINGTON ET AL. 1996, GILBERTSON & LUCAS 1996, ROBERTS ET AL. 1997, NELSON & VAN BEL 1998, SIMON-BUELA & GARCIA-ARENAL 1999, OPARKA & SANTA CRUZ 2000). Dabei werden die Viren sowohl als RNA-Protein-Komplexe als auch, wie PVY, als intakte Virionen transportiert (NELSON & VAN BEL 1998, SANTA CRUZ ET AL. 1998, SANTA CRUZ 1999).

An den *sinks* findet eine Entladung der Viren aus dem Phloem statt, die durch konfokale *laser scanning* Mikroskopie für GFP-markierte Viren sichtbar gemacht werden kann (ROBERTS ET AL. 1997) und an den auftretenden Schadbildern erkennbar ist.

In unserem Versuchssystem traten in der inokulierten Pflanze nach 4-6 Tagen Schadbilder in den *sink*-Blättern auf.

Durch unsere Versuchsanordnung, bei der eine virusinfizierte mit einer nichtinfizierten Tabakpflanze über eine *Cuscuta*-Brücke verbunden war, gelang es, nicht nur den Virustransport aus der Wirtspflanze in den Parasiten, sondern auch aus dem Parasiten in eine zweite Wirtspflanze durch molekularbiologische Methoden zweifelsfrei nachzuweisen und damit einen weiteren Beweis über das Vorhandensein von symplastischen Verbindungen zwischen den beiden Partnern zu erbringen. Da die inokulierte erste Wirtspflanze (Donorpflanze) stets länger als 14 Tage mit *Cuscuta* parasitiert war, kann davon ausgegangen werden, dass bereits eine funktionelle Verbindung zwischen den Phloemen von Wirt und Parasit bestand und der Virus über diese transportiert wurde. Der anschließende Transport in der *Cuscuta*-Achse erfolgt passiv mit dem Assimilatstrom. Wir konnten jedoch in keinem Experiment, auch bei unterschiedlichen langen Versuchszeiten, den Virus in der Brücke nachweisen. Die Menge lag immer unter der Nachweisgrenze des ELISA. Das kann dadurch erklärt werden, dass der Brückenabschnitt der *Cuscuta*-Achse hauptsächlich Transportfunktion besitzt, in den kernlosen Siebröhren kann keine Vermehrung des Virus stattfinden. Es ist anzunehmen, dass auch der seitliche Austritt in das umliegende Gewebe vernachlässigbar gering ist.

Der Übertritt des Virus in die zweite Wirtspflanze ist theoretisch auf zwei Wegen möglich: über Suchhyphen bei der Ausbildung des Haustoriums und über die miteinander verbundenen Siebröhren von Wirt und Parasit.

Das sich bei Infektion der Akzeptorpflanze entwickelnde Haustorium stellt innerhalb der *Cuscuta*-Achse neben der wachsenden Spitze einen zusätzlichen *sink* dar und wird bevorzugt mit den aus der virusinfizierten Donorpflanze stammenden Assimilaten und Viren versorgt, was zur Verlangsamung des Spitzenwachstums führt. Die sich im Wirtsgewebe nach allen Seiten ausbreitenden Suchhyphen (Abb. 3-38) sind mit den Parenchymzellen über verzweigte sekundäre Plasmodesmen verbunden (Abb. 3-40, 3-41, 3-43). Da in den *sinks* eine Entladung der Assimilate und der Viren erfolgt, besteht aufgrund der strukturellen Voraussetzungen die Möglichkeit eines symplastischen Übertritts der Viren in das Wirtsgewebe, von wo aus eine weitere Verbreitung über Plasmodesmen von Zelle zu Zelle, verbunden mit einer Vermehrung erfolgen kann. Für einen Transport über das Phloem in die *sink*-Blätter, in denen wir sowohl durch Schadbilder als auch durch RNA-Analyse und ELISA den Virus nachweisen konnten, müssten die Viren sich bis in die *source*-Blätter ausbreiten oder aus dem Stengelgewebe entlang des *path* in das Phloem beladen werden.

Der zweite Weg des Übertritts, direkt über Plasmodesmen (oder Siebporen?) von den sich zu Siebröhren differenzierenden Suchhyphen des Parasiten in die Siebröhren des Wirtes, erscheint daher im Hinblick auf den Transport des Virus zu den *sink*-Blättern in der Akzeptorpflanze effektiver und wahrscheinlicher. Er ist jedoch erst in späteren Stadien der Haustorienentwicklung möglich und setzt neben einer bereits bestehenden direkten

Verbindung der Siebelemente beider Partner an der Kontaktstelle auch einen zu diesem Zeitpunkt noch in Richtung Akzeptorpflanze verlaufenden Assimilattransport voraus.

In *Vicia*-Brückenversuchen konnten wir durch Translokation von CF aus der Parasiten-Achse in die Wirtspflanze einen solchen Transport nachweisen (Abb. 3-36, 3-37).

Obwohl nur an einer Akzeptorpflanze deutliche Virussympptome beobachtet wurden, konnte der Virus serologisch in allen Akzeptorpflanzen in den *sink*-Blättern nachgewiesen werden. Der serologische Nachweis in den *sink*-Bereichen des Parasiten, im apikalen sowie im haustorienbildenden Achsenabschnitts, war abhängig von der Versuchsanordnung und der Parasitierungsdauer, wie die Ergebnisse aus zwei Versuchsreihen mit unterschiedlichen Parasitierungszeiten zeigten.

In der ersten Versuchsreihe wurden bereits 14 Tage mit *Cuscuta* parasitierte Tabakpflanzen (Donorpflanzen) mit PVY inokuliert. Zwischen Wirt und Parasit besteht zu diesem Zeitpunkt bereits eine funktionelle Verbindung, über die der Virus in *Cuscuta* übertreten kann. Am Tag der Virusinokulation wurde auch die freie Achse zur Ausbildung von Haustorien an einer virusfreien zweiten Tabakpflanze (Akzeptorpflanze) befestigt. In der Donorpflanze kam es in den folgenden Tagen zur Ausbreitung des Virus. 4-6 Tage nach Inokulation der *source*-Blätter konnten erste PVY-typische Symptome an den *sink*-Blättern beobachtet werden. An der Akzeptorpflanze begann ab dem vierten Tag im fixierten Abschnitt der *Cuscuta*-Achse die Haustorienentwicklung. Dieser Bereich stellt damit einen zusätzlichen, gegenüber der Spitze stärkeren *sink* dar. Zusammen mit den aus der virusinfizierten Pflanze stammenden Assimilaten gelangen die zu diesem Zeitpunkt im Phloem befindlichen Viren in die sich im Parenchym entwickelnden Suchhyphen und von dort über Plasmodesmen in die Parenchymzellen der Akzeptorpflanze. Diese Brückensysteme wurden 18 Tage nach Parasitierung der Akzeptorpflanze aufgearbeitet.

Die *sink*-Blätter zeigten deutliche Virus-Symptome und sowohl RNA-Analysen als auch ELISA ergaben positive Virus-Nachweise. In der *sink*-Region der freien *Cuscuta*-Achse fiel der Nachweis jedoch negativ aus, die Viruskonzentration war zu gering. Die Viren wandern aus der Donorpflanze über die *Cuscuta*-Brücke offensichtlich bevorzugt in das sich entwickelnde Haustorium und von dort zunächst über die Suchhyphen, später über die offene Phloemverbindung in die Akzeptorpflanze. Der Transport in die wachsende Spitze war wesentlich geringer. In sie ist auch dann kein nennenswerter Virustransport zu erwarten, wenn bei der relativ langen Versuchsdauer von 18 Tagen ein Transport von Assimilaten aus der Akzeptorpflanze in die *Cuscuta* beginnt. Der Virus liegt in der Akzeptorpflanze hauptsächlich in den *sink*-Blättern vor. Gleichzeitig sollte mit dem zunehmenden Transport von Assimilaten aus der Akzeptorpflanze, die Versorgung aus der virusinfizierten Donorpflanze geringer werden.

In der zweiten Versuchsreihe wurden die *source*-Blätter der Donorpflanze bereits am siebenten Tag nach Beginn der Parasitierung mit *Cuscuta* inokuliert und der Parasit erst nach weiteren sieben Tagen auf die Akzeptorpflanze übergeleitet. Die Parasitierungsdauer betrug hier nur 11 Tage, umfasste also im wesentlichen das Suchhyphen-Stadium. Obwohl keine Schadbilder zu beobachten waren, konnten mit ELISA Viren in den *sink*-Blättern nachgewiesen werden. Im Gegensatz zur ersten Versuchsreihe war auch ein Nachweis des

Virus im apikalen Bereich der *Cuscuta*-Achse möglich. Durch den längeren Zeitraum zwischen Inokulation der Donorpflanze und Parasitierung der Akzeptorpflanze konnte bereits eine Ausbreitung des Virus in den zu diesem Zeitpunkt einzigen *sink*, die wachsende Spitze, erfolgen, bevor durch die Entwicklung des Haustorium der Transport bevorzugt in Richtung Akzeptorpflanze erfolgte. Wir fanden in Pflanzen dieser Versuchreihe auch Schäden an den Parasitenachsen. Sie äußerten sich in einer Braunfärbung der Spitzen (Abb. 3-31B). Bisher ist nur wenig über Virussymptome an *Cuscuta* bekannt. COSTA (1944) berichtet bei der Übertragung des Gurkenmosaikvirus über Verkrümmungen an *C. campestris*, verkürzten Internodien und, den auch von uns beobachteten, vermehrten Austrieb von Seitenknospen, der im Extremfall zur Hexenbesenbildung führen kann. SCHMELZER (1956) beobachtete eine signifikante virusinduzierte Reduktion der Internodienlänge an *C. campestris* bei Übertragung des Tabakmauchevirus.

SCHMELZER (1956) benutzte in seinen Experimenten ebenfalls PVY. Obwohl er fünf Virus-Stämme und acht *Cuscuta*-Arten (*C. campestris*, *C. subinclusa* rotblättrig bzw. weißblättrig, *C. californica*, *C. gronovii*, *C. americana*, *C. epiphytum*, *C. europaea*, *C. lupiliformis*) verwendete, war in keinem Fall ein Transport des Virus aus der Wirtspflanze (*Nicotiana glutinosa*) in den Parasiten nachzuweisen. Es ist bekannt, dass einzelne *Cuscuta*-Arten nur bestimmte Viren übertragen. Aber auch bei verschiedenen Formen der gleichen Art sind unterschiedliche Vektoreigenschaften beschrieben worden. So überträgt z.B. die rotblättrige *C. subinclusa* den Tabakmauchevirus häufig, die weißblättrige Form dagegen gar nicht oder nur sehr selten. Die von uns im Gegensatz zu SCHMELZER (1956) erhaltene positive Übertragung von PVY könnte somit sowohl auf die Verwendung einer anderen *Cuscuta*-Art (*C. reflexa*), einer anderen Wirtspflanze (*N. tabacum* cv. SNN) sowie eines anderen Stammes von PVY (Stamm-N) zurückzuführen sein. Daneben ist aber sicher auch die Empfindlichkeit der Nachweismethoden für den Virus ausschlaggebend. SCHMELZER (1956) wies den Transport des Virus aus der Wirtspflanze in *Cuscuta* nach, indem er gesunde Pflanzen mit dem *Cuscuta*-Presssaft inokulierte und nach auftretenden Schadbildern bonitierte. Diese Methode ist, verglichen mit dem von uns benutzten ELISA, der auch bei nicht ausgeprägten Schadbildern einen zweifelsfreien Virusnachweis zuließ, außerordentlich unempfindlich.

Außer dem durch *Cuscuta* vermittelten Transport eines Virus (PVY<sup>N</sup>) aus dem Wirt in den Parasiten und aus dem Parasiten in eine zweite Wirtspflanze konnte auch ein in gleicher Weise erfolgreicher Transfer eines Makromoleküls, des 27 kDa großen *green fluorescent protein* (GFP), nachgewiesen werden.

Die Untersuchungen wurden mit transgenen *Arabidopsis*-Pflanzen, die GFP im Phloem transportieren, als Donorpflanzen und *Arabidopsis*-Wildtyppflanzen als Akzeptorpflanzen durchgeführt. Wir parasitierten die Donorpflanzen zunächst für 14 Tage mit *Cuscuta* und befestigten anschließend den kontaktreizbaren Abschnitt zur Haustorienausbildung an der Akzeptorpflanze.

Ergebnisse aus den Untersuchungen zum Transport des GFP aus transgenen Wirtspflanzen in den Parasiten, lassen eindeutig die Aussage zu, dass zu diesem Zeitpunkt eine funktionelle

Phloemverbindung zwischen beiden Partnern besteht, über die das Protein zusammen mit den Assimilaten in die *Cuscuta* transportiert wird (Kap. 3.3.2.2).

*Cuscuta* parasitierte an der zweiten Pflanze 19 Tage. Da bei einer mikroskopischen Analyse zu diesem Zeitpunkt keine Fluoreszenz in der Haustorialregion der Akzeptorpflanze detektiert werden konnte, wurde ein Nachweis des GFP über Western Blot durchgeführt.

Das Brückensystem wurde dazu in definierte Abschnitte zerschnitten und diese zum molekularbiologischen Nachweis von GFP aufgearbeitet.

Das Protein war in der Akzeptorpflanze im parasitierten Abschnitt der Blütenstandsachse und in den *sinks*, d.h. der Blüte und den sich bereits entwickelnden Schoten eindeutig nachweisbar (Abb. 3-33 Abschnitt 7-8), was auf seinen Transport gemeinsam mit den Assimilaten hinweist. Aufgrund der Größe kann GFP nur auf symplastischen Weg aus dem Parasiten in den Wirt gelangen. Ein Transport während der Ausbildung des Haustoriums schließt eine Entladung aus dem Leitgewebe des Parasiten und einen Zell-Zell-Transport bis zu den Suchhyphen und von dort in die Parenchymzellen des Wirtes ein. Dieser erfordert Plasmodesmen mit einer Ausschlussgröße von mindestens 27 kDa zwischen den Zellen. IMLAU ET AL (1999) fanden in den *sinks* von *Arabidopsis thaliana* einen post-phloem Zell-Zell-Transport von GFP. ITAYA ET AL (2000) konnten eine Ausbreitung des GFP's zwischen Epidermiszellen von Blättern und Infloreszenzachsen von *Arabidopsis thaliana* zeigen. Wir haben die frühen Stadien der Haustorienentwicklung an der Akzeptorpflanze bisher nicht mikroskopisch ausgewertet. Bei längerer Parasitierungsdauer war, wie oben erwähnt, keine Fluoreszenz in der Haustorialregion sichtbar, obwohl nach den Ergebnissen der Western Blot Analyse das Protein in die Akzeptorpflanze transportiert wurde.

Mit der Entladung des GFP aus der Parasitenachse und dem anschließenden Zell-Zell-Transport bis zur Suchhyphne wäre jedoch nur der Transport in das Parenchym des infizierten Blütenstandsabschnittes zu erklären, nicht aber der Transport in die *sinks* der Akzeptorpflanze. Dieser ist nur über einen Transport im Phloem möglich. Es ist schwer vorstellbar, dass GFP aus dem Wirtsparenchym der Blütenstandsachse wieder in das Phloem beladen wird.

Ein Transport des Proteins in der Achse in Richtung Rosettenblätter konnte nicht nachgewiesen werden. Alle Abschnitte unterhalb der Parasitierung zeigten keinen positiven GFP-Nachweis. Die Ergebnisse sprechen vielmehr dafür, dass das GFP direkt aus dem Phloem des Parasiten in das Phloem des Wirtes gelangt und in ihm gemeinsam mit den Assimilaten zu den wirtseigenen *sinks* transportiert wird.

Für einen solchen Phloem-Phloem-Transfer vom Parasiten in den Wirt sprechen auch die Brückenversuche mit radioaktiv markierter Saccharose. Dabei wurden zwei *Vicia*-Pflanzen über eine *Cuscuta*-Brücke miteinander verbunden. Im Gegensatz zu den Brückenversuchen mit Viren und GFP, deren Versuchszeitraum auch das Stadium der Haustorienentwicklung an der Akzeptorpflanze einschloss, parasitierte *Cuscuta* zum Zeitpunkt der Saccharose-Applikation bereits für mindestens 14 Tage an der Akzeptorpflanze, so dass man davon ausgehen kann, dass die Differenzierung der Suchhyphen abgeschlossen war und bereits eine funktionelle Leitbündelverbindung bestand. Auch in diesem Stadium bezieht der Parasit noch

Assimilate aus der ersten Wirtspflanze. Die Verteilungsmuster von Saccharose zeigten, dass innerhalb der Parasitenachse zwei *sinks* bestehen, die um die Verteilung der Saccharose konkurrieren. Dabei ist die Spitze eindeutig der stärkere *sink*. Aber auch im zweiten *sink*, dem Achsenabschnitt, der das Haustorium an der Akzeptorpflanze bildet, findet eine Entladung der Assimilate statt, die dann über die Leitgewebe des Haustoriums in Richtung Akzeptorpflanze transportiert werden. Sowohl in dem parasitierten Achsenabschnitt als auch in den Achsenabschnitten ober- und unterhalb der Parasitierung der Akzeptorpflanze waren zweifelsfrei radioaktive Verbindungen nachweisbar.

Die mikroskopische Darstellung des Weges, über den Saccharose unter diesen Versuchsbedingungen aus dem Parasiten in den Wirt gelangt, erfolgte mit dem Fluoreszenzfarbstoff Carboxyfluorescein (CF). Die bereits in den vorangegangenen Abschnitten diskutierten Eigenschaften des Farbstoffes und seine mehrfach nachgewiesene Verteilung nach dem gleichen Muster wie die Assimilate rechtfertigen diesen methodischen Ansatz. Da zwischen Donor- und Akzeptorpflanze eine lange Transportstrecke liegt, die zu einer starken Verdünnung und damit schlechter Nachweisbarkeit des Farbstoffes führen würde, applizierten wir den Ester des Farbstoffes (CFDA) nicht über die Blätter der Donorpflanze sondern durch Injektion in die intakte *Cuscuta*-Brücke oder, nach Zerschneiden der Brücke, durch Einstellen der *Cuscuta*-Achse in die Farbstofflösung. Die Entfernung zwischen Applikation des Farbstoffs und Haustorium betrug stets ca. 10-15 cm.

In beiden Fällen war ein Übertritt des CF aus dem Phloem des Parasiten über das Haustorium in das Phloem des Wirtes sichtbar. Dieser damit nachgewiesene Transport über die miteinander verbundenen Leitsysteme des Phloems aus dem Parasiten in den Wirt besteht sicherlich nur über einen kurzen Zeitraum innerhalb der Haustorienentwicklung. Nicht bei allen von uns untersuchten Brückensystemen konnten wir einen solchen Transport nachweisen. Von den 17 von uns untersuchten Systemen zeigten nur 53 % einen Transport von Saccharose in die Akzeptorpflanze. *Cuscuta* wird in diesen Fällen, wie die Verteilungsmuster der  $^{14}\text{C}$ -Saccharose zeigten, noch vorwiegend aus der ersten Wirtspflanze versorgt. Die Leitbündelverbindung in der zweiten Pflanze ist zwar schon vorhanden, aber die Pflanze spielt als *source* noch keine Rolle. Es ist zu erwarten, dass in dem Moment, in dem die Nährstoffzufuhr aus der Donorpflanze nachlässt, die Akzeptorpflanze zum *source* für den Parasiten wird. Die Richtung des Assimilatstromes innerhalb des Haustoriums würde sich damit ändern. In diesem Stadium sollte auch kein Transport von Substanzen aus dem Parasiten in den Wirt mehr möglich sein, wenn nicht im Haustorium ein bidirektionaler Transport von Assimilaten in benachbarten Siebröhren stattfindet, wie er von ESCHRICH (1967) für Internodien von *Vicia faba* beschrieben wurde. Dafür gibt es jedoch bisher keine experimentellen und strukturellen Anhaltspunkte. Wir halten ihn eher für unwahrscheinlich.

## 4.5 Zelluläre Strukturen

Bei der Suche nach zellulären Strukturen für den Transfer von Substanzen zwischen Wirt und Parasit konnten in den Suchhyphen Plasmodemesmen nachgewiesen werden. Nach ihrer Entstehung handelt es sich dabei um sekundäre Plasmodemesmen (EHLERS & KOLLMANN 2001). Sie verbinden die Protoplasten von Wirt und Parasit miteinander. Die Ausbildung solcher interspezifischen Plasmodemesmen tritt auch bei Pfropfungen auf (KOLLMANN ET AL. 1985, KOLLMANN & GLOCKMANN 1985, 1991). Durch Parasitierung von *Cuscuta* auf transgenen Tabakpflanzen, die eine GFP-Fusion mit dem *movement protein* (MP) des Tabakmosaik-Virus (TMV) exprimieren (TMV MP-GFP Tabak, siehe Tab. 2-1), konnten die Plasmodemesmen in den Suchhyphen als verzweigte Plasmodemesmen charakterisiert werden. Nur diese werden, wie in zahlreichen Arbeiten gezeigt wurde, durch das *movement protein* des Virus markiert (ATKINS ET AL. 1991, DING ET AL. 1992, OPARKA ET AL. 1996a, 1996b, PADGETT ET AL. 1996, ROBERTS ET AL. 2001). Auch im Elektronenmikroskop waren überwiegend verzweigte Plasmodemesmen zu erkennen. Daneben wurden vereinzelt auch einfache unverzweigte Plasmodemesmen beobachtet. Ob sie tatsächlich vorkommen, kann aufgrund der verschiedenen Schnittebenen nicht eindeutig belegt werden. Molekulare Marker, wie das MP-GFP für verzweigte Plasmodemesmen, sind für einfache Plasmodemesmen bisher nicht bekannt.

Wesentlich schwieriger gestaltete sich der elektronenmikroskopische Nachweis der symplastischen Kontakte zwischen den Leitsystemen. Im Gegensatz zu Pfropfungen, wo die Ausbildung der verbindenden Phloemelemente mit interspezifischen Siebporen aus undifferenzierten Kalluszellen durch synchrone Differenzierung der Zellen beider Partner erfolgt (MONZER & KOLLMANN 1986, KOLLMANN & GLOCKMANN 1990), trifft die Suchhyphne des Parasiten auf vollständig ausdifferenzierte Leitelemente des Wirtes.

Für die Xylemelemente konnte gezeigt werden, dass sich die Hyphen in Nachbarschaft von Xylemelementen des Wirtes ebenfalls zu Xylemelementen differenzieren. Sichtbar wird dies durch die Ausbildung von Wandverdickungen in der Parasitenzelle und einer Degeneration des Protoplasten (Abb. 3-44). Die Analyse der Verhältnisse beim Phloemanschluss ist komplizierter. Häufig wurden *Cuscuta*-Hyphen, die eine strukturelle Differenzierung zu Siebelementen zeigten, in unmittelbarer Nachbarschaft von Siebelementen gefunden. In den Zellwänden zwischen beiden Zellen waren plasmatische Verbindungen, die von einem Callosemantel umgeben waren, zu sehen. Ob es sich bei dem Siebelement um eine Zelle des Wirtes handelt, muss in weiteren Untersuchungen mit Hilfe wirtsspezifischer Marker zweifelsfrei geklärt werden. Wir haben solche Marker, wie es z.B. Phloemplastiden sein könnten, in unseren Schnitten bisher nicht gefunden. Zwischen den Siebelementen des Parasiten bestehen offene Verbindungen über zahlreiche Siebporen (Abb. 3-45). Im Gegensatz zur Wirtszelle sind die Parasitenzellen durch spezifische Marker (elektronendichte Cytosomen) eindeutig zu identifizieren (Abb. 3-46).

Für das Wirt-Parasit-System *Vicia narbonensis-Orobancha crenata* besteht eine direkte Verbindung der Siebelemente von Wirt und Parasit über interspezifische Poren. Sie entwickeln sich aus interspezifischen Plasmodemesmen (DÖRR & KOLLMANN 1994).

Nach den Ergebnissen unserer Transportexperimente und den Hinweisen aus den Untersuchungen zur Ultrastruktur sind solche Verbindungen auch für die Wirt-Parasit-Systeme mit *Cuscuta* anzunehmen. Sie würden den schnellen und nichtselektiven Stofftransfer zwischen Wirt und Parasit erklären. Die in den Experimenten mit GFP-Ubiquitin postulierte Ausschlussgröße der plasmatischen Verbindungen zwischen *Arabidopsis* und *Cuscuta spec.* spricht nicht gegen solche Verbindungen. Die Siebporen entwickeln sich bei *Orobancha* aus Plasmodiesmen (DÖRR & KOLLMANN 1994), von denen anzunehmen ist, dass sie nur eine begrenzte, wesentlich geringere Ausschlussgröße als die Poren besitzen. Dieser Entwicklungszustand könnte bei unseren Untersuchungen vorgelegen haben.

Obwohl auch in dieser Arbeit kein endgültiger cytologischer Nachweis für eine offene Verbindung zwischen dem Phloem des Wirtes und dem Phloem des Parasiten erbracht werden konnte, lassen die Ergebnisse der Transportuntersuchungen keinerlei Zweifel an einem symplastischen Transfer der Substanzen aus den Wirtspflanzen in *Cuscuta* zu. Dafür spricht insbesondere der nachgewiesene Transport des Virus und des GFP sowohl aus dem Wirt in den Parasiten als auch aus dem Parasiten in den Wirt. Eine Membranpassage, wie sie ein apoplastischer Transfer zwischen den beiden Partnern erfordert, ist sowohl für PVY als auch für GFP ausgeschlossen. Ihr Transport kann nur symplastisch erfolgen.

Über die offene Verbindung zwischen den Assimilatleitbahnen zwischen beiden Partnern kann nach unseren Ergebnissen in einem wahrscheinlich sehr begrenztem Zeitraum auch ein Transport vom Parasiten in den Wirt erfolgen. In Brücken-Experimenten, bei denen die *source*-Blätter in der ersten Pflanze und in der zweiten Pflanze mit unterschiedlich markierter Saccharose gefüttert werden, sollte es möglich sein, diesen Zeitraum einzugrenzen. Ein weiterer methodischer Ansatz wären auch Experimente mit einem Brückensystem, bei dem Donor- und Akzeptorpflanze GFP mit Fluoreszenzlicht unterschiedlicher Wellenlänge exprimieren.

Der GFP-Transport aus transgenen *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen nicht nur in *Cuscuta reflexa*, sondern auch in *Cuscuta odorata* und in *Cuscuta platyloba* sowie die übereinstimmenden Ergebnisse zum CF-Transport in Wirt-Parasit-Systemen mit Wirtspflanzen aus vier unterschiedlichen Familien und *Cuscuta reflexa* sprechen auch dafür, dass zwischen *Cuscuta*-Arten und ihren Wirtspflanzen generell ein symplastischer Transfer der Assimilate stattfindet. Nach neueren Arbeiten dient das Phloem durch den Transport von RNA auch als Informations- und Kommunikationssystem innerhalb der Pflanze und spielt so eine wichtige Rolle bei der Regulation physiologischer Prozesse (LUCAS & WOLF 1999, RUIZ-MEDRANO ET AL. 2001). In weiteren Experimenten sollte daher geprüft werden, ob in den Wirt-Parasit-Systemen über die symplastische Verbindung neben den bisher nachgewiesenen Transportsubstanzen (Saccharose, Xenobiotika, Farbstoffe, GFP, Viren) Entwicklungsprozesse in Wirt und Parasit durch den Austausch von Makromolekülen gesteuert werden.

## 5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen zum Stoffübertritt im Xylem und im Phloem zwischen der holoparasitischen Blütenpflanze *Cuscuta spec.* und ihren Wirtspflanzen durchgeführt.

Neben Experimenten zur Translokation von Saccharose, Aminosäuren, Xenobiotika und Fluoreszenzfarbstoffen erfolgten auch Versuche zum Transport von Viren und Makromolekülen. Für letztere benutzten wir transgene Pflanzen von *Arabidopsis thaliana*, die das *green fluorescent protein* (GFP) in den Geleitzellen exprimieren und im Phloem gemeinsam mit den Assimilaten zu den *sinks* transportieren.

Durch die Transportuntersuchungen mit den unterschiedlichen Substanzen sollte geklärt werden, ob zwischen dem Parasiten und seinen Wirtspflanzen eine symplastische Verbindung gebildet wird.

Nach einer Parasitierungsdauer von 12 bis 14 Tagen waren in allen Wirt-Parasit-Systemen durchgängige funktionelle Verbindungen zwischen den Leitbündeln des Wirtes und des Parasiten ausgebildet, die durch die Fluoreszenzfarbstoffe Texas red Dextran (Xylem) bzw. Carboxyfluorescein und Hydroxypyrentrisulfonsäure (Phloem) im konfokalen *laser scanning* Mikroskop dargestellt wurden. Die Leitbündel im Haustorium bestehen aus zentral angeordneten großlumigen Xylemelementen, die allseitig von Phloemelementen umgeben sind.

Der Transport von Substanzen aus dem Wirt in den Parasiten über das Xylem ist wegen der eingeschränkten Transpiration von *Cuscuta* sehr gering. Bei Applikation der xylemmobilen Xenobiotika Diuron und Atrazin an Wurzeln bzw. wurzellose Explantate von parasitierten *Vicia faba*-Pflanzen gelangten nur zwischen 1 und 5 % der transportierten Verbindungen in den Parasiten. Innerhalb der *Cuscuta*-Achse befanden sich ca. 75 % der Verbindungen in der Haustorialregion.

Der Transport im Xylem aus dem Wirt in den Parasiten ist nicht selektiv, *Cuscuta* nimmt alle im Xylem des Wirtes transportierten Substanzen auf. Neben Diuron und Atrazin waren auch über die Wurzel von *Vicia faba* appliziertes Cadmium sowie in der Wurzel der Wirtspflanze *Nicotiana spec.* synthetisiertes Nicotin im Parasiten nachweisbar.

Für die ambimobilen Verbindungen  $\alpha$ -Aminoisobuttersäure (AIB) und das Herbizid Glyphosat wurden im Vergleich zu Diuron und Atrazin wesentlich höhere Anteile an transportierten Verbindungen im Parasiten gemessen. Sie betragen bei Wurzelapplikation ca. 15 %, bei Applikation über die untere Schnittfläche wurzelloser Explantate zwischen 30 und 35 %. Innerhalb des Parasiten befand sich der Hauptanteil der Verbindungen stets im wachsenden Spitzenabschnitt. Diese Substanzen gelangen hauptsächlich über das Phloem in die *Cuscuta*. Der dazu notwendige Xylem-Phloem-Transfer findet nach unsere Untersuchungen in den Internodien der Wirtspflanzen statt, beblätterte und blattlose Wirt-Parasit-System zeigten übereinstimmende Verteilungsmuster.

Der Transport über das Phloem ist wesentlich intensiver als über das Xylem. Bei einer Versuchsdauer von 24 Stunden gelangten z.B. im Wirt-Parasit-System *Arabidopsis thaliana-Cuscuta reflexa* ca. 71 % der aus den Rosettenblättern austransportierten radioaktiv markierten Saccharose in den Parasiten.

*Cuscuta* kann aus den im Phloem des Wirtes transportierten Verbindungen nicht auswählen. Nach Applikation eines Gemisches von  $^3\text{H}$ -Saccharose und  $^{14}\text{C}$ -markiertem Xenobiotikum, Methylchlorphenoxyessigsäure (MCPA) bzw. Glyphosat, an die Blätter der Wirtspflanze *Vicia faba* gelangten von beiden Substanzen übereinstimmende Anteile in den Parasiten. Dieses Ergebnis ist mit einem apoplastischen Transfer nicht vereinbar. Bei ihm wären, wegen der bei diesem Mechanismus notwendigen Membranpassagen, unterschiedliche Mengen von beiden Substanzen im Parasiten zu erwarten. Unser Ergebnis spricht vielmehr für einen Transport der Verbindungen im Symplasten.

Nach Applikation der als Marker für einen symplastischen Transport geltenden Fluoreszenzfarbstoffe Carboxyfluorescein (CF) und Hydroxypyrentrisulfonsäure (HPTS) an die Wirtspflanze war im konfokalen *laser scanning* Mikroskop eine durchgehende Fluoreszenzmarkierung vom Phloem des Wirtes über die Phloemelemente im Haustorium bis zum Phloem des Parasiten sichtbar.

Das Vorhandensein plasmatischer Verbindungen bestätigen auch der nachgewiesene Übertritt des Kartoffelvirus Y (PVY) und des 27 kDa großen GFP aus den Wirtspflanzen in den Parasiten. Das 35,5 kDa große Fusionsprotein aus GFP und Ubiquitin wurde dagegen nicht aus den transgenen *Arabidopsis*-Pflanzen in *Cuscuta* transportiert, obwohl eine durch CF darstellbare durchgehende plasmatische Verbindung zwischen beiden Partnern vorhanden war und auch ein Transport von Saccharose in den Parasiten erfolgte.

Für Saccharose, den Virus und für das GFP wurde in Brückenversuchen neben einem Transport aus dem Wirt in den Parasiten auch ein Transport aus dem Parasiten in den Wirt nachgewiesen.

Die Suchhyphen des Parasiten sind über verzweigte Plasmodesmen mit den Parenchymzellen der Wirtspflanze verbunden. Bei der Parasitierung von *Cuscuta reflexa* auf transgenen Tabakpflanzen, die ein an GFP gekoppeltes *movement protein* (MP) des Tabakmosaikvirus exprimieren, war im konfokalen *laser scanning* Mikroskop eine punktförmige Fluoreszenzmarkierung in den Wänden der Suchhyphen erkennbar.

Die Differenzierung der Kontakthyphe zu Xylemelementen erfolgt in Nachbarschaft des Wirtsxylems durch Ausbildung von Wandverdickungen und Degeneration des Protoplasten.

Im Elektronenmikroskop wurden wiederholt Suchhyphen mit Anzeichen der Differenzierung zu einem Siebelement - Degeneration des Tonoplasten und cytoplasmatischer Strukturen - in Nachbarschaft von ausdifferenzierten Siebelementen gefunden. Zwischen beiden Zellen waren von einem Callosemantel umgebene plasmatische Verbindungen sichtbar. Wegen fehlender zellulärer Marker können diese Zellen aber nicht eindeutig dem Wirt zugeordnet werden.

Die erhaltenen Ergebnisse der Untersuchungen zur Translokation von Assimilaten, Xenobiotika, Fluoreszenzfarbstoffen, insbesondere aber der nachgewiesene Transfer von Viren und GFP, widersprechen der bisherigen Vorstellung von einem apoplastischen Übertritt

der Verbindungen aus dem Phloem des Wirtes in den Parasiten. Ein solcher Schritt wäre, wenn überhaupt, lediglich im Suchhyphenstadium und nur für Saccharose und Aminosäuren vorstellbar. Nach erfolgtem Leitbündelkontakt und vollständiger Differenzierung der Kontakthyphe besteht zwischen *Cuscuta* und ihren kompatiblen Wirtspflanzen ein symplastischer Phloemkontakt. Für die Allgemeingültigkeit dieser Aussage sprechen übereinstimmende Ergebnisse zum CF-Transport in Wirt-Parasit-Systemen mit Wirtspflanzen aus vier unterschiedlichen Familien und *Cuscuta reflexa*, sowie der erfolgreiche GFP-Transport aus transgenen *Arabidopsis*-Pflanzen in drei unterschiedliche *Cuscuta*-Arten.

## 6 Tabellenverzeichnis

Die Tabellen beinhalten die Zahlenwerte zu den Abbildungen in Kapitel 3.

**Tab. A: *Vicia faba-Cuscuta reflexa***

**Wachstum der *Cuscuta*-Achsen während der Ausbildung des funktionellen Haustorienanschlusses. (Abb. 3-1)**

Tage der Parasitierung	Gesamtlänge [cm]	Zuwachs [cm]
0	21,0 ± 0,0	0
2	24,0 ± 0,2	3,0
4	30,1 ± 1,8	5,9
8	34,1 ± 0,5	4,0
12	50,6 ± 5,8	16,5
18	98,7 ± 14,9	48,2

n=4, mean ± SE;

**Tab. B: *Vicia faba-Cuscuta reflexa***

**Veränderungen des Kohlenhydratgehaltes in den *Cuscuta*-Achsen während der Ausbildung des funktionellen Haustorienanschlusses. (Abb. 3-2)**

Tage der Parasitierung	prozentualer Kohlenhydratgehalt in der <i>Cuscuta</i> -Achse			
	alle Kohlenhydrate	Stärke	lösliche Kohlenhydrate (Gluc, Fruc, Sacch.)	Saccharose
0	100	100	100	100
2	76,8	57,2	99,8	188,7
4	48,7	27,3	54,3	97,8
8	39,9	20,2	49,5	98,3
12	88,1	49,4	97,0	184,2

Der Gehalt der Ausgangsachsen wurde =100% gesetzt und die Werte der jeweiligen Versuchstage darauf bezogen. Der Berechnung lagen die Gehalte ausgedrückt in µg Glucoseeinheiten/Achse zu Grunde. n=4, mean±SE

Tab. C: *Cuscuta reflexa*

Veränderung des Kohlenhydratgehaltes in den einzelnen Achsenabschnitten während der Parasitierung von *Cuscuta*-Achsen an *Vicia faba*. (Abb. 3-3)

Achsenabschnitt	Dauer der Parasitierung					
	0 Tage		4 Tage		8 Tage	
	Saccharose µg	%	Saccharose µg	%	Saccharose µg	%
1	324,1	12,1	69,5	2,7	131,1	4,1
2			896,2	34,4	1525,8	48,1
3	446,4	16,7	522,3	20,1	815,3	25,7
4	488,1	18,3	456,3	17,5	313,2	9,9
5	507,5	19,0	438,6	16,8	260,7	8,2
6	906,1	33,9	222,0	8,5	126,1	4,0
gesamte Achse	2672,2	100	2604,9	100	3172,2	100

Achsenabschnitt	Monosaccharide		Monosaccharide		Monosaccharide	
	µg	%	µg	%	µg	%
	1	1,5	0,0	0,0	0,0	40,4
2			689,6	56,4	1325,3	78,8
3	98,6	1,2	113,1	9,2	132,3	7,9
4	2332,6	26,8	163,6	13,4	73,7	4,4
5	3162,3	36,4	180,2	14,7	80,3	4,8
6	3094,0	35,6	77	6,3	28,6	1,7
gesamte Achse	8689,0	100	1223,5	100	1680,6	100

Achsenabschnitt	Stärke		Stärke		Stärke	
	µg	%	µg	%	µg	%
	1	611,7	3,5	171,4	2,4	522,8
2			3228,9	46,0	3345,8	63,8
3	6092,5	35,0	2035,1	29,0	554,1	10,6
4	4475,8	25,7	873,5	12,4	578,4	11,0
5	3641,5	20,9	410,0	5,8	121,1	2,3
6	2598,9	14,9	308,6	4,4	125,7	2,4
gesamte Achse	17420,4	100	7027,5	100	5247,9	100

Der Gesamtgehalt der einzelnen Kohlenhydrate in den Achsen wurde gleich 100% gesetzt und die Gehalte der einzelnen Abschnitte an den jeweiligen Versuchstagen auf diesen Wert bezogen.

n=4, mean ± SE

**Tab. D: *Vicia faba-Cuscuta reflexa***

Verteilungsmuster der im Xylem mobilen Substanzen DCMU und Atrazin bzw. der ambimobilen Substanzen AIB und Glyphosat in unterschiedlichen Versuchssystemen. (Abb. 3-7)

**wurzellose Wirt-Parasit-Systeme (Explantate)****Verteilungsmuster im gesamten Wirt-Parasit-System**

Abb. 3-7A	Substanz	prozentualer Gehalt an transportierten Substanzen		
		Achse	Blätter	<i>Cuscuta</i> gesamt
	<b>DCMU (+Blätter)</b>	45,67 ± 5,48	50,24 ± 5,24	4,10 ± 1,04
	<b>DCMU (-Blätter)</b>	96,30	-	3,70 ± 0,60
	<b>Atrazin</b>	39,38 ± 9,60	57,88 ± 9,32	2,74 ± 0,49
	<b>AIB</b>	47,68 ± 4,25	17,65 ± 3,90	34,67 ± 6,48
	<b>Glyphosat (+Blätter)</b>	17,94 ± 2,42	52,56 ± 5,74	29,50 ± 3,79
	<b>Glyphosat (-Blätter)</b>	63,87	-	36,13 ± 7,62

**Verteilungsmuster in der *Cuscuta***

Abb. 3-7B	Substanz	prozentualer Gehalt an transportierten Substanzen	
		Achse	Haustorium
	<b>DCMU (+Blätter)</b>	25,52 ± 4,90	74,50 ± 4,90
	<b>DCMU (-Blätter)</b>	44,2 ± 7,32	55,8 ± 7,32
	<b>Atrazin</b>	21,96 ± 6,92	78,04 ± 6,92
	<b>AIB</b>	76,86 ± 5,09	23,14 ± 5,09
	<b>Glyphosat (+Blätter)</b>	87,14 ± 1,82	12,85 ± 1,83
	<b>Glyphosat (-Blätter)</b>	84,99 ± 3,79	15,01 ± 3,79

**bewurzelte Wirt-Parasit-Systeme****Verteilungsmuster im gesamten Wirt-Parasit-System**

Abb. 3-7C	Substanz	prozentualer Gehalt an transportierten Substanzen		
		Achse	Blätter	<i>Cuscuta</i> gesamt
	DCMU	93,23 ± 2,23	5,88 ± 2,37	0,90 ± 0,47
	Glyphosat (+Blätter)	19,39 ± 7,44	65,32 ± 7,69	15,30 ± 0,54
	Glyphosat (-Blätter)	81,05 ± 9,83	-	18,95 ± 9,83
	AIB (+Blätter)	72,70 ± 8,38	12,43 ± 5,27	14,86 ± 3,88
	AIB (-Blätter)	88,31 ± 4,71	-	11,69 ± 4,71

**Verteilungsmuster in der *Cuscuta***

Abb. 3-7D	Substanz	prozentualer Gehalt an transportierten Substanzen	
		Achse	Haustorium
	DCMU	17,63 ± 1,45	82,37 ± 1,45
	Glyphosat (+Blätter)	81,72 ± 5,36	18,26 ± 5,34
	Glyphosat (-Blätter)	79,67 ± 5,33	20,33 ± 5,33
	AIB (+Blätter)	78,30 ± 2,67	21,70 ± 2,67
	AIB (-Blätter)	70,51 ± 2,52	29,49 ± 2,52

**Tab. E: *Vicia faba-Cuscuta reflexa***

**Verteilungsmuster von Cadmium im Wirt-Parasit-System nach Applikation von CdCl<sub>2</sub> an die Wurzel der Wirtspflanze Versuchsdauer: 6 Tage. (Abb. 3-8)**

Abb. 3-8A	Abschnitt	Anteil an transportiertem Cadmium [%]
	1 (freie <i>Cuscuta</i> -Achse)	4,19 ± 1,34
	2 (Blätter oberhalb der Parasitierung)	5,93 ± 1,33
	3 ( <i>Vicia</i> -Achse oberhalb der Parasitierung)	8,38 ± 2,63
	4 ( <i>Cuscuta</i> Haustorialstück ohne Haustorialkeile)	22,54 ± 2,56
	5 (parasitierte <i>Vicia</i> -Achse mit inserierten Haustorialkeilen)	58,94 ± 3,79

## Verteilungsmuster von Cadmium zwischen Wirt und Parasit

Abb. 3-8B	Abschnitt	Anteil an transportiertem Cadmium [%]
	<i>Cuscuta</i>	10,13 ± 2,67
	<i>Vicia</i>	89,87 ± 1,79

Die Bestimmung des Cadmium-Gehaltes erfolgte durch AAS. Zur Berechnung der Verteilungsmuster wurde der im Wirt-Parasit-System außerhalb der Wurzel gemessene Gehalt =100% gesetzt und der Gehalt der einzelnen Abschnitte auf diesen Wert bezogen

n=6, mean ± SE

Tab. F: *Vicia faba-Cuscuta reflexa*

Verteilungsmuster von <sup>3</sup>H-Saccharose und <sup>14</sup>C-Xenobiotika im Wirt-Parasit-System. (Abb. 3-12)

Abb. 3-12A	Substanz	prozentualer Anteil an transportierten Substanzen			
		<i>Vicia uh</i> Parasitierung	<i>Vicia</i> parasitiert	<i>Vicia oh</i> Parasitierung	<i>Cuscuta</i>
	<sup>3</sup> H Saccharose	12,06 ± 1,81	41,25 ± 1,82	11,03 ± 1,17	35,65 ± 2,40
	<sup>3</sup> H Saccharose	12,54 ± 3,38	41,95 ± 5,69	8,25 ± 1,48	37,26 ± 6,23
	<sup>14</sup> C-Glyphosat	14,15 ± 3,10	42,59 ± 5,35	10,66 ± 2,25	32,61 ± 6,18
	<sup>3</sup> H Saccharose	9,89 ± 2,15	42,28 ± 3,86	14,74 ± 3,05	33,09 ± 2,38
	<sup>14</sup> C-MCPA	12,92 ± 2,49	43,50 ± 4,42	14,97 ± 3,97	28,61 ± 2,43

Verteilungsmuster von <sup>3</sup>H-Saccharose in der *Cuscuta*

Abb. 3-12B	Substanz	prozentualer Anteil an transportierten Substanzen	
		Haustorialstück	freie <i>Cuscuta</i> -Achse
	<sup>3</sup> H Saccharose	56,84 ± 4,94	43,16 ± 4,94
	<sup>3</sup> H-Saccharose	57,88 ± 5,85	42,12 ± 5,85
	<sup>14</sup> C-Glyphosat	52,20 ± 5,68	47,80 ± 5,68
	<sup>3</sup> H-Saccharose	55,79 ± 5,52	44,21 ± 5,52
	<sup>14</sup> C-MCPA	61,20 ± 6,11	38,80 ± 6,11

<sup>3</sup>H-Saccharose und <sup>14</sup>C-Xenobiotikum wurden auf das Blatt oberhalb der Parasitierung als Substanzgemisch appliziert. Zur Berechnung des Verteilungsmusters wurde bei (A) die Summe der Radioaktivität im Wirt-Parasit-System außerhalb des Blattes, bei (B) in der gesamten *Cuscuta*=100% gesetzt und der Gehalt der einzelnen Abschnitte auf diesen Wert bezogen. Die erste Wert zeigt zum Vergleich die bei Einzelapplikation von <sup>3</sup>H-Saccharose erhaltenen Werte.

Einzelapplikation von <sup>3</sup>H Saccharose n=9, Applikation der Substanzgemische n=10; mean ± SE

## 7 Literaturverzeichnis

- ASHTON F.M., SANTANA D. 1976: *Cuscuta* spp. (dodder): a literature review of its biology and control. *Div. Agric., Univ. California Bull.* 1880: 24 pp.
- ATKINS D., HULL R., WELLS B., ROBERTS K., MOORE P., BEACHY R.N. 1991: The tobacco mosaic virus 30k movement protein in transgenic tobacco plants is localized to plasmodesmata. *J. Gen. Virol.* 72: 209-211.
- BACCARINI A. 1966: Autotrophic incorporation of  $^{14}\text{CO}_2$  in *Cuscuta australis* in relation to its parasitism. *Experientia* 21: 1-5.
- BALACHANDRAN S., XIANG Y., SCHOBERT C., THOMPSON G.A., LUCAS W.J. 1997: Phloem sap proteins from *Cucurbita maxima* and *Ricinus communis* have the capacity to traffic cell to cell through plasmodesmata. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 14150-14155.
- BARCKHAUS R., WEINERT H. 1974: Eine parasitische Pflanze (*Cuscuta odorata*) auf Pelargonien [Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen]. *Mikrokosmos* 63: 238-248.
- BÄUMEL P., JESCHKE W.D., WITTE L., CZYGAN F.-C., PROKSCH P. 1993: Uptake and transport of quinolizidine alkaloids in *Cuscuta reflexa* parasitizing on *Lupinus angustifolius*. *Z. Naturforsch.* 48c: 436-443.
- BÄUMEL P., JESCHKE W.D., RÄTH N., CZYGAN F.-C., 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: 1721-1730.
- BENNETT C.W. 1940: Acquisition and transmission of viruses by dodder (*Cuscuta subinclusa*). (Abstr.) *Phytopathology* 30: 2.
- BENNETT C.W. 1944a: Latent virus of dodder and its effects on sugar beet and other plants. *Phytopathology* 34: 77-91.
- BENNETT C.W. 1944b: Studies of dodder transmission of plant viruses. *Phytopathology* 34: 905-932.
- BENNETT C.W. 1956: Biological relations of plant viruses. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 7: 143-170.
- BIGALKE H. 1974: *Cuscuta reflexa* als Testorganismus für das Mobilitätsverhalten von fünf verschiedenen radioaktiv markierten Substanzen im Wirt-Parasit-System *Vicia faba*-*Cuscuta reflexa* ROXB. Diplomarbeit, Sektion Biowissenschaften. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- BIRSCHWILKS M. 2000: Untersuchungen zur Ernährungsweise isolierter Achsen der parasitischen Blütenpflanze *Cuscuta reflexa* ROXB. Diplomarbeit, Fachbereich Biologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- BIRSCHWILKS M., TSCHIRSCH H., NEUMANN ST. 2001: Photosynthetic activity of detached stems of *Cuscuta reflexa* ROXB. in: Fer A., Thalouarn P., Joel D.M., Musselman L.J., Parker C., Verkleij J.A.C. (eds). *Proceedings of the 7<sup>th</sup> International Parasitic Weed Symposium*. Faculté des Sciences, Université de Nantes, Nantes, France. p. 156.

- BÖCKENHOFF A., GRUNDLER F.M.W. 1994:** Studies on the nutrient uptake by the beet cyst nematode *Heterodera schachtii* by *in situ* microinjection of fluorescent probes into the feeding structures in *Arabidopsis thaliana*. *Parasitology* 109: 249-254.
- BÖCKENHOFF A., PRIOR D.A.M., GRUNDLER F.M.W., OPARKA K.J. 1996:** Induction of phloem unloading in *Arabidopsis thaliana* roots by the parasitic nematode *Heterodera schachtii*. *Plant Physiol.* 112: 1421-1427.
- BOSTWICK D.E., DANNENHOFFER J.M., SKAGGS M.I., LISTER R.M., LARKINS B.A., THOMPSON G.A. 1992:** Pumpkin phloem lectin genes are specifically expressed in companion cells. *Plant Cell* 4: 1539-1548.
- BOUYA D. 1986:** Etude de l'absorption du saccharose par les suçoirs d'une phanérogame parasite: *Cuscuta reflexa* Roxb. Thèse de Doctorat, Université Scientifique et Médicale de Grenoble.
- BUKOVAC M.J., WITWER S.H. 1957:** Absorption and mobility of foliar applied nutrient. *Plant Physiol.* 32: 428-435.
- CARRINGTON J.C., KASSCHAU K.D., MAHAJAN S.K., SCHAAD M.C. 1996:** Cell-to-Cell and Long-Distance Transport of Viruses in Plants. *Plant Cell* 8: 1669-1681.
- CHOUDHURY N.K., SAHU D. 1999:** Photosynthesis in *Cuscuta reflexa*: A total plant parasite. *Photosynthetica* 36: 1-9.
- CHRISTENSEN N.M., DÖRR I., HANSEN M., VAN DER KOOLJ T.A.W., SCHULZ A. 2003:** Development of *Cuscuta* species on an partially incompatible host: induction of xylem transfer cell. *Protoplasma* 220: 131-142.
- CHURCH G.M., GILBERT W. 1984:** Genomic sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 1991-1995.
- CLARK A.M., JACOBSON K.R., BOSTWICK D.E., DANNENHOFFER J.M., SKAGGS M.I., THOMPSON G.A. 1997:** Molecular characterization of a phloem-specific gene encoding the filament protein, Phloem Protein 1 (PP1), from *Cucurbita maxima*. *Plant J.* 12: 49-61.
- COSTA A.S. 1944:** Multiplication of virus in dodder, *Cuscuta campestris*. *Phytopathology* 34: 151-162.
- CZYGAN F.C., WESSINGER B., WARMUTH K. 1988:** *Cuscuta* und ihre Fähigkeit zur Aufnahme und Speicherung von Alkaloiden der Wirtspflanze. *Biochem. Physiol. Pflanzen* 183: 495-501.
- DA SILVA M.C., SHELP B.J. 1990:** Xylem-to-phloem transfer of organic nitrogen in young soybean plants. *Plant Physiol.* 92: 797-801.
- DANNENHOFFER J.M., SCHULZ A., SKAGGS M.J., BOSTWICK D.E., THOMPSON G.A. 1997:** Expression of the phloem lectin is developmentally linked to vascular differentiation in cucurbits. *Planta* 201: 405-414.
- DAWSON J H., MUSSELMAN L.J., WOLSWINKEL P., DÖRR I. 1994:** Biology and control of *Cuscuta*. *Rev. Weed Sci.* 6: 265-317.
- DE BOCK F. 1990:** Contribution à l'étude des mécanismes impliqués dans le transfert du saccharose, l'interface hôte-parasite, entre *Pelargonium zonale* L. Aiton et *Cuscuta reflexa* Roxb. Thèse de Doctorat. Université Scientifique et Médicale de Grenoble.

- DING B., HAUDENSHIELD J.S., HULL R.J., WOLF S., BEACHY R.N., LUCAS W.J. 1992:** Secondary plasmodesmata are specific sites of localization of the tobacco mosaic virus movement protein in transgenic tobacco plants. *Plant Cell* 4: 915-928.
- DING X.S., SHINTAKU M.H., CARTER S.A., NELSON R.S. 1996:** Invasion of minor veins of tobacco leaves inoculated with tobacco mosaic virus mutants defective in phloem-dependent movement. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 11155-11160.
- DING X.S., CARTER S.A., DEOM C.M., NELSON R.S. 1998:** Tobamovirus and potyvirus accumulation in minor veins of inoculated leaves from representatives of the Solanaceae and Fabaceae. *Plant Physiol.* 116: 125-136.
- DÖRR I. 1968:** Zur Lokalisation von Zellkontakten zwischen *Cuscuta odorata* und verschiedenen höheren Wirtspflanzen. *Protoplasma* 65: 435-448.
- DÖRR I. 1968a:** Plasmatische Verbindungen zwischen artfremden Zellen. *Naturwissenschaften* 55: 396.
- 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. 1987:** The haustorium of *Cuscuta* - new structural results. In: Weber H.Chr., Forstreuter W., Parasitic Flowering Plants (Proceedings of the 4<sup>th</sup>. ISFPF, Marburg 1987): 163-170.
- DÖRR I. 1990:** Sieve elements in haustoria of parasitic angiosperms. In: Behnke, H.D., Sjolund, R.D. (eds.): Sieve elements - Comparative structure, induction and development. Springer: Heidelberg: 239-256.
- DÖRR I. 1996:** New results on interspecific bridges between parasites and their hosts. In: Advances in Parasitic Plant Research, eds. Moreno M.T., Cubero J.I., Berner D., Joel D., Musselman L.J., Parker C., (Spain, Junta de Andalucia): 196-201
- DÖRR I., KOLLMANN R. 1994:** Symplasmic Sieve Element Continuity between *Orobancha* and its Host. *Bot. Acta* 108: 47-55.
- DUCKETT C.M., OPARKA K.J., PRIOR D.A. M., DOLAN L., ROBERTS K. 1994:** Dye-coupling in the root epidermis of *Arabidopsis* is progressively reduced during development. *Development* 120: 3247-3255.
- EHLERS K., KOLLMANN R. 2001:** Primary and secondary plasmodesmata: structure, origin and function. *Protoplasma* 216: 1-30.
- ESAU K. 1977:** Anatomy of seed plants. John Wiley and sons: New York.
- ESCHRICH W. 1966:** Translokation <sup>14</sup>C-markierter Assimilate im Licht und im Dunkeln bei *Vicia faba*. *Planta* 70: 99-124.
- ESCHRICH W. 1967:** Bidirektionelle Translokation in Siebröhren. *Planta* 73: 37-49.
- ESCHRICH W. 1980:** Free space invertase, its possible role in phloem unloading. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* 93: 63-378.
- FER A. 1976a:** Photosynthèse et respiratio des plantules de *Cuscuta lupiliformis* Krock., au cours de leur vie prèparasitaire. *Physiol. Vég.* 14: 357-365.

- FER A. 1976b:** Utilisation des produits de la photosynthèse chez les plantules de *Cuscuta lupuliformis* Krock., au cours de leur vie préparasitaire. *C.R. Acad. Sci., Paris*, 282: 1725-1727.
- FER A. 1976c:** Absorption, migration et utilisation des phosphates chez les plantules de *Cuscuta gronovii* Willd., au cours de leur vie préparasitaire. *Biol. Plantarum* 18: 450-459.
- FER A. 1979:** Contribution à la physiologie de la nutrition des Phanérogames parasites: étude du genre *Cuscuta* L. (Convolvulaceae). THÈSE présentée à L'Université scientifique et médicale de grenoble pour obtenir le grade de docteur ès sciences
- FER A., CHAMEL A. 1983:** Transport of two phloem-mobile labelled herbicides from the host plant to *Cuscuta*. *Z. Pflanzenphysiol.* 111: 333-340.
- FER A., DE BOCK F., RENAUDIN S., REY L., THALOUARN P. 1987:** Relation trophiques entre Angiospermes parasites et leurs hotes respectifs. II. Voies de transport et mécanismes impliqués dans le transfert des substances trophiques à l'interface hôte-parasite. *Bulletin de la Societe Botanique Francaise* 134: 109-120.
- FISHER D.B., WU Y., KU M.S.B. 1992:** Turnover of soluble proteins in the wheat sieve tube. *Plant Physiol.* 100: 1433-1441.
- FURUHASHI K., TADA Y., OKAMOTO K., SUGAI M., KUBOTA M., WATANABE M. 1997:** Phytochrome participation in induction of haustoria in *Cuscuta japonica*, a holoparasite flowering plant. *Plant Cell Physiol.* 38: 935-940.
- GAMALEI Y. 1989:** Structure and function of leaf minor veins in trees and herbs. *Trees* 3: 96-110.
- GARDNER D.C.J., PEEL A.J. 1971:** Metabolism and transport of <sup>14</sup>C-labeled glutamic and aspartic acid in the phloem of willow. *Phytochemistry* 10: 2385-2387.
- GILBERTSON R.L., LUCAS W.J. 1996:** How do viruses traffic on the vascular highway? *Trends Plant Sci.* 1: 260-268.
- GOLDWASSER Y., LANINI W.T., WROBEL R.S. 2001:** Tolerance of tomato varieties to lespeleza dodder. *Weed Sci.* 49: 520-523.
- GOLECKI B., SCHULZ A., CARSTEN-BEHRENS U., KOLLMANN R. 1998:** Evidence for graft transmission of structural phloem proteins or their precursors in heterografts of *Cucurbitaceae*. *Planta* 206: 630-640.
- GOLECKI B., SCHULZ A., THOMPSON G.A. 1999:** Translocation of structural P proteins in the phloem. *Plant Cell* 11: 127-140.
- GOODWIN P.B. 1983:** Molecular size limit for movement in the symplast of *Elodea densa* leaf. *Planta* 157: 124-130.
- GOUGLER J.A., GEIGER D.R. 1981:** Uptake and distribution of N-Phosphonomethylglycine in sugar beet plants. *Plant Physiol.* 68: 668-672.
- GOUGLER J.A., GEIGER D.R. 1984:** Carbon partitioning and herbicide transport in glyphosate-treated sugar beet (*Beta vulgaris*). *Weed Sci.* 32: 546-551.
- GRIGNON N., TOURAINÉ B., DURAND M. 1989:** 6(5)-Carboxyfluorescein as a tracer of phloem sap translocation. *Amer. J. of Bot.* 76: 871-877.

- GRIMM E., BERNHARDT G., ROTHE K., JACOB F. 1990:** Mechanism of sucrose retrieval along the phloem path - a kinetic approach. *Planta* 182: 480-485.
- GRIMM E., GRUBE A., JAHNKE S., NEUMANN ST. 1995:** Retention of xenobiotics along the phloem path. *Planta* 197: 11-18.
- GRIMMER G. MACHLEIDT H., SCHWANITZ F., TSCHESCHE R. 1958:** Selektive Aufnahme von Digitalisglykosiden durch Cuscutaarten. *Z. Naturforsch.* 13b: 672-677.
- Haidar M.A., ORR G.L., WESTRA P. 1997:** Effects of light and mechanical stimulation on coiling and prehaustoria formation in *Cuscuta* spp. *Weed Res.* 37: 219-228.
- Haidar M.A., ORR G.L., WESTRA P. 1998:** The response of dodder (*Cuscuta* spp.) seedlings to phytohormones under various light regimes. *Ann. Appl. Biol.* 132: 331-338.
- HAUGLAND R.P. 2002:** Handbook of Fluorescent Probes and Research Products. Ninth Edition. Molecular Probes.
- HAUPT S. 2001:** Transfer phloemmobiler Substanzen von Wirtspflanzen zum Parasiten *Cuscuta reflexa*. Dissertation Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technische Fakultät Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- HAUPT S., DUNCAN G., HOLZBERG S., OPARKA K.J. 2001b:** Evidence for symplastic unloading in sink leaves of barley. *Plant Physiol.* 125: 209-218.
- HAUPT S., OPARKA K.J., SAUER N., NEUMANN ST. 2001a:** Macromolecular trafficking between *Nicotiana tabacum* and the holoparasite *Cuscuta reflexa*. *J. Exp. Bot.* 52: 173-177.
- HAYASHI H., FUKUDA A., SUZUI N., FUJIMAKI S. 2000:** Proteins in the sieve element-companion cell complexes: their detection, localisation and possible functions. *Aust. J. Plant Physiol.* 27: 489-496.
- HEIDE-JORGENSEN H.S. 1987:** Changes in cuticle structure during development and attachment of the upper haustorium of *Cuscuta* L., *Cassytha* L., and *Viscum* L. In: Weber H.Ch., Forstreuter W. (eds.) Parasitic flowering plants, Marburg: pp. 319-334.
- HEIDE-JORGENSEN H.S. 1991:** Notes on structure of the adhesive disk of *Cuscuta*. In: Ransom J.K., Musselman L.J., Worsham A.D., Parker C. (eds.) Proceed. of the 5<sup>th</sup> international symposium of parasitic weeds. Nairobi, Kenia: p. 513
- HEINTZ W. 1989:** Transmission of a new mycoplasma-like organism (MLO) from *Cuscuta odorata* (Ruiz & Pav.) to herbaceous plants and attempts to its elimination in the vector. *J. Phytopath.* 125: 171-186.
- HIBBERD J.M., BUNGARD R.A., PRESS W.D., SCHOLES J.D., QUICK W.P. 1998:** Localization of photosynthetic metabolism in the parasitic angiosperm *Cuscuta reflexa*. *Planta* 205: 506-513.
- HIRNER B., FISCHER W.N., RENTSCH D., KWART M., FROMMER W.B. 1998:** Developmental control of H<sup>+</sup>/amino acid permease gene expressing during seed development of *Arabidopsis*. *Plant J.* 14: 535-544.
- HOSFORD R.M. JR. 1967:** Transmission of plant viruses by dodder. *Bot. Rev.* 33: 387-406.

- IHL B., MIERSCH I. 1996: Susceptibility and resistance of *Lycopersicon* to infection by *Cuscuta*. In: Advances in Parasitic Plant Research, eds. Moreno M.T., Cubero J.I., Berner D., Joel D., Musselman L.J., Parker C., (Spain, Junta de Andalucia): pp. 599-607.
- IHL B., WIESE, K. 2000: Studien an *Cuscuta reflexa* ROXB. VIII. Mechanische Haustorieninduktion an nichtwindenden Achsen des Parasiten. *Flora* 195: 1-8.
- IMLAU A., TRUENIT E., SAUER, N. 1999: Cell-to-cell and long-distance trafficking of the green fluorescent protein in the phloem and symplastic unloading of the protein into sink tissue. *Plant Cell* 11: 309-322.
- ISHIWATARI Y., HONDA C., KAWASHIMS I., NAKAMURA S.I., HIRANO H., MORI S., FUJIWARA T., HAYASHI H., CHINO M. 1995: Thioredoxin h is one of the major proteins in rice phloem sap. *Planta* 195: 456-463.
- ISHIWATARI Y., FUJIWARA T., MC FARLAND K.C., NEMOTO K., HAYASHI H., CHINO M., LUCAS W.J. 1998: Rice phloem thioredoxin h has the capacity to mediate its own cell-to-cell transport. *Planta* 205: 12-22.
- ITAYA A., LIANG G., WOO Y.-M., NELSON R.S., DING B. 2000: Non-specific intercellular protein trafficking probed by green fluorescent protein in plants. *Protoplasma* 213: 165-175.
- JAHNKE B. 1975: Untersuchungen zum Transport xenobiotischer Stoffe im Wirt-Parasit-System *Vicia faba-Cuscuta reflexa*. Diplomarbeit Sektion Biowissenschaften Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- JANARDHANARAO G., BHARTI S., LALORAYA M.M. 1984: Photosystems of *Cuscuta santapau* Banerji & Das Chloroplasts. *Photosynthetica* 18: 596-599.
- JESCHKE W.D., PATE J.S. 1991: Modelling of the uptake flow and utilization of carbon nitrogen and water within whole plants of *Ricinus communis* L. based on empirical data. *J. Plant Physiol.* 137: 488-498.
- JESCHKE W.D., RÄTH N., BÄUMEL P., CZYGAN F.-C., PROKSCH 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. Exp. Bot.* 45: 791-800.
- JESCHKE W.D., RÄTH N., BÄUMEL P., CZYGAN F.-C., PROKSCH 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. Exp. Bot.* 45: 801-812.
- JESCHKE W.D., BAIG A., HILPERT A. 1997: Sink-stimulated photosynthesis, increased transpiration and increased demand-dependent stimulation of nitrate uptake: nitrogen and carbon relations in the parasitic association *Cuscuta reflexa-Coleus blumei*. *J. Exp. Bot.* 48: 915-25.
- JESCHKE W.D., 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.

- JESCHKE W.D., HARTUNG W. 2000:** Root-shoot interactions in mineral nutrition. *Plant and Soil* 226: 57-69.
- JOHANSEN I.E., EDWARDS M.C., HAMPTON R.O. 1994:** Seed transmission of viruses: Current perspectives. *Annu. Rev. Phytopathol.* 32: 363-386.
- JOHNSON F. 1941a:** Transmission of viruses by the parasitic activities of dodder. *Phytopathology* 31: 13.
- JOHNSON F. 1941b:** Transmission of plant viruses by dodder. *Phytopathology* 13: 649-656.
- KAMINSKA M., KORBIN M. 1999:** Graft and dodder transmission of phytoplasma affecting lily to experimental hosts. *Acta Physiol. Plantarum* 21: 21-26.
- KEHR J., HAEBEL S., BLECHSCHMIDT-SCHNEIDER S., WILLMITZER L., STEUP M., HSAHN J. 1999:** Analysis of phloem protein patterns from different organs of *Cucurbita maxima* Duch. By matrix-assisted laser desorption/ionisation time of light mass spectroscopy combined with sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Planta* 207: 612-619.
- KELLMANN J.W. 2001:** Identification of plant virus movement-host protein interactions. *Z. Naturforsch.* 56c: 669-679.
- KEMPERS R., PRIOR D.A.M., VAN BEL A.J.E., OPARKA K.J. 1993:** Plasmodesmata between sieve element and companion cell of extrafascicular stem phloem of *Cucurbita maxima* permit passage of 3 kDa fluorescent probes. *Plant J.* 4: 567-575.
- KEMPERS R., VAN BEL A.J.E. 1997:** Symplastic connections between sieve element and companion cell in the stem phloem of *Vicia faba* L. have a molecular exclusion limit of at least 10 kDa. *Planta* 201: 195-201.
- KING R.W., ZEEVARRD J.A.D. 1974:** Enhancement of phloem exudation from cut petioles by chelating agents. *Plant Physiol.* 53: 96-103.
- KNOBLAUCH M., 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. Abh.* (Hanstein) 2: 1-136.
- KOLLMANN R., GLOCKMANN CH. 1985:** Studies on graft unions. I. Plasmodesmata between cells belonging to different unrelated taxa. *Protoplasma* 124: 224-235.
- KOLLMANN R., YANG S., GLOCKMANN CH. 1985:** Studies on graft unions. II. Continuous and half plasmodesmata in different region of the graft interface. *Protoplasma* 126: 19-29.
- KOLLMANN R., DÖRR I. 1987:** Parasitische Blütenpflanzen (Systematik und Verbreitung der Parasiten). *Naturwissenschaften* 74: 12-21.
- KOLLMANN R., GLOCKMANN CH. 1990:** Sieve elements of graft unions. In: Behnke H.D., Sjolund R.D., (eds) Sieve elements - Comparative structure, induction and development. Springer: Berlin, pp. 219-237.
- KOLLMANN R., GLOCKMANN CH. 1991:** Studies on graft unions. III. On the mechanism of secondary formation of plasmodesmata at the graft interface. *Protoplasma* 165: 71-85.
- KÜHN C., FRANCESCHI V.R., SCHULZ A., LEMOINE R., FROMMER W.B. 1997:** Macromolecular Trafficking Indicated by Localization of Sucrose Transporters in Eucleate Sieve Elements. *Science* 275: 1298-1300.

- KULT J. 1969:** The biology of parasitic flowering plants. University of California, press: Berkeley and Los Angeles.
- KUO J., PATE J.S., RAINBIRD R.M., ATKINS C.A. 1980:** Internodes of grain legumes - new location for xylem parenchyma transfer cells. *Protoplasma* 104: 181-185.
- LAEMMLI U.K. 1970:** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- LAMBERTZ P. 1954:** Untersuchungen über das Vorkommen von Plasmodesmen in den Epidermisaußenwänden. 82 Bl.: ILL., Graph. Darst.
- LANE H.C., KASPERBAUER M.J. 1965:** Photomorphogenic responses of dodder seedlings. *Plant Physiol.* 40: 109-116.
- LAUDI G., BONATTI P.M., FRICANO G. 1974:** Ultrastructure of plastids of parasitic higher plants. V. Influence of light on *Cuscuta* plastids. *Israel Journal of Botany* 23: 145-150.
- LAYZELL D.B., PATE J.S., ATKINS C.A., CANVIN D.T. 1981:** Partitioning of carbon and nitrogen and the nutrition of root and shoot apex in an nodulated legume. *Plant Physiol.* 67: 30-36.
- LAZAROWITZ S.G. 1999:** Probing plant cell structure and function with viral movement proteins. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2: 332-338.
- LAZAROWITZ S.G., BEACHY R.N. 1999:** Viral movement proteins as probes for intracellular and intercellular trafficking in Plants. *Plant Cell* 11: 535-548.
- LEE K.B., LEE C.D. 1989:** The structure and development of the haustorium of *Cuscuta australis*. *Canad. J. Bot.* 67: 2975-2982.
- LEHRACH H., DIAMOND D., WOZNEY J.M., BOEDTKER H. 1977:** RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions: A critical reexamination. *Biochemistry* 16: 4743-4751.
- LEISNER S.M., TURGEON R. 1983:** Movement of virus and photoassimilate in the phloem: A comparative analysis. *Bioassays* 15: 741-748.
- LÖFFLER C., CZYGAN F.C., PROKSCH P. 1999:** Role of indole-3-acetic-acid in the interaction of the phanerogamic parasite *Cuscuta* and host plants. *Plant Biol.* 1: 613-617.
- LOGEMANN J., SCHELL J., WILLMITZER L. 1987:** Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. *Anal. Biochem.* 163: 16-20.
- LUCAS W.J., GILBERTSON R.L. 1994:** Plasmodesmata in relation to viral movement within leaf tissues. *Annu. Rev. Phytopathol.* 32: 387-411.
- LUCAS W.J., WOLF S. 1999:** Connections between virus movement, macromolecular signalling and assimilate allocation. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2: 192-197.
- MACHADO M.A., ZETSCHKE K. 1990:** A structural, functional and molecular analysis of plastids of the holoparasites *Cuscuta reflexa* and *Cuscuta europaea*. *Planta* 181: 91-96.
- MACLEOD D.G. 1962:** Some anatomical and physiological observations on two species of *Cuscuta*. *Bot. Soc. Edinburgh* 39: 302-316.
- MACLEOD D.G. 1963:** The parasitism of *Cuscuta*. *New Phytol.* 62: 257-263.

- MALIK C.P., SINGH M.B. 1979:** Physiological and biochemical aspects of parasitism in *Cuscuta* - a review. *Ann. Rev. Plant Sci.* 1: 67-113.
- MARAMBE B., WIJESUNDARA S., TENNAKOON K., PINDENIYA D., JAYASINGHE CH. 2002:** Growth and development of *Cuscuta chinensis* Lam. and its impact on selected crops. *Weed Biology and Management* 2: 79-83.
- MARTIN M.M., LINDQUIST L. 1976:** The pH-dependence of fluorescein fluorescence. *Journal of Luminescence* 10: 381-390.
- MATTHEWS R.E.F. 1991:** Plant virology, 3rd ed.: 200-202. Academic Press: London.
- MINCHIN P.E.H., THORPE M.R. 1987:** Measurement of unloading and reloading of photoassimilate within the stem of bean. *J. Exp. Bot.* 38: 211-220.
- MISRA P.C., SETTY P.N., SINGH D.V., LAL R.K., VISWANATHAN P.N., SAXENA Y.R., KRISHNAN P.S. 1970:** Heterogeneity in composition along the length of *Cuscuta* filaments. *Physiol. Plant.* 23: 1025-1032.
- MONZER J., KOLLMANN R. 1986:** Vascular connections in the heterograft *Lophophora williamsii* Coult. on *Trichocereus spachianus* Ricc. *J. Plant Physiol.* 123: 359-372.
- MÜLLER F. 1969:** Zusammenhänge zwischen Entwicklungsalter, Kohlenhydrathaushalt und Transport von <sup>14</sup>C-MCPA bei einigen mehrjährigen Unkräutern. *Z. Pflanzenkrankh. Pflanzenschutz* 76: 473-483.
- MÜNCH E. 1930:** Die Stoffbewegungen in der Pflanze. Fischer: Jena.
- NAGAR R., SINGH M., SANWAL G.G. 1984:** Cell wall degrading enzymes in *Cuscuta reflexa* and its host. *J. Exp. Bot.* 35: 1104-1112.
- NAKAMURA S.I., HAYASHI H., MORI S., CHINO M. 1993:** Protein phosphorylation in the sieve tubes of rice plants. *Plant Cell Physiol.* 34: 927-933.
- NELSON R.S., VAN BEL A.J.E. 1998:** The mystery of virus trafficking into, through and out of vascular tissue. *Progress in Botany* 59: 476-533.
- NEUMANN ST., JACOB F. 1968:** Studien an *Cuscuta reflexa* Roxb. I. Zur Funktion der Haustorien bei der Aufnahme von Saccharose. *Flora, Abt. A.* 159: 191-203.
- NEUMANN ST., GRIMM E., JACOB F. 1985:** Transport of xenobiotics in higher plants. I. Structural prerequisites for translocation in the phloem. *Biochem. Physiol. Pflanzen* 180: 257-268.
- NEUMANN ST., HAUPT S. 1996:** Sucrose hydrolysis by invertase is no prerequisite for the transfer of assimilates from the host plants to the parasite *Cuscuta reflexa*. *J. Exp. Bot.* 47: 1302-1303.
- NEUMANN ST., HAUPT S. 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., Parker C.: 355-364.
- OPARKA K.J. 1991:** Uptake and compartmentation of fluorescent probes by plant cells. *J. Exp. Bot.* 42: 565-579.
- OPARKA K.J., DUCKETT C.M., PROIR D.A.M., FISHER D.B. 1994:** Real-time imaging of phloem unloading in the root tip of *Arabidopsis*. *Plant J.* 6: 756-766.

- OPARKA K.J., PROIR D.A.M., WRIGHT K.M. 1995:** Symplastic communication between primary and developing lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.* 46: 187-197.
- OPARKA K.J., BOEVINK P., SANTA CRUZ S. 1996a:** Studying the movement of plant viruses using green fluorescent protein. *Trends Plant Sci.* 1: 412-418.
- OPARKA K.J., ROBERTS A.G., ROBERTS I.M., PRIOR D.A.M., SANTA CRUZ S. 1996b:** Viral coat protein is targeted to, but does not gate, plasmodesmata during cell-to-cell movement of potato virus X. *Plant J.* 10: 805-813.
- OPARKA K.J., ROBERTS A.G., BOEVINK P., SANTA CRUZ S., ROBERTS L., PRADEL K.S., IMLAU A., KOTLITZKY G., SAUER N., EPEL B. 1999:** Simple, but not branched, plasmodesmata allow the non-specific trafficking of proteins in developing tobacco leaves. *Cell* 97: 743-754.
- OPARKA K.J., SANTA CRUZ S. 2000:** The great escape: Phloem transport and unloading of macromolecules. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51: 323-347.
- ORMÖ M., CUBITT A.B., KALLIO K., GROSS L.A., TSIEN R.Y., REMINGTON S.J. 1996:** Crystal Structure of the *Aequorea victoria* Green Fluorescent Protein. *Science* 273: 1392-1395.
- PADGETT H.S., EPEL B.L., KAHN T.W., HEINLEIN M., WATANABE Y., BEACHY R.N. 1996:** Distribution of tobamovirus movement protein in infected cells and implications for cell-to-cell spread of infection. *Plant J.* 10: 1079-1088.
- PALIYATH G., MAHESWARI R., MAHADEVAN S. 1978:** Initiation of haustoria in *Cuscuta* by cytokinin application. *Curr. Sci.* 47: 427-429.
- PANDA M.M., CHOUDHURY N.K. 1992:** Effect of irradiance and nutrients on chlorophyll and carotenoid content and Hill reaction activity in *Cuscuta reflexa*. *Photosynthetica* 26: 585-592.
- PANT D.D., BANERJI R. 1965:** Epidermal structure and development of stomata in some *Convolvulaceae*. *Senck. Biol.* 46: 155-173.
- PATE J.S. 1984:** The carbon and nitrogen nutrition of fruit and seed- case studies of selected grain legumes. In: Murray D.R. (ed.) Seed physiology. Vol. I, Academic press: pp. 41-81.
- PATE J.S. 1986:** Xylem-to-phloem transfer - vital component of the nitrogen partitioning system of a nodulated legume. In: Cronshaw J., Lucas W.J., Giaquinta A.R. (eds.) Phloem transport. A.R. Liss: New York: 41-81.
- PATRICK J.W. 1990:** Sieve element unloading: cellular pathways, mechanisms and control. *Physiol. Plant.* 78: 298-308.
- PIZZOLONGO P. 1963:** Sui pigmenti di *Cuscuta pentagona* Engelm. *Estr. da DELPINO* 5: 9-16.
- PIZZOLONGO P. 1964:** Sulla ultrastruttura dei caulicini di *Cuscuta pentagona* Engelm. nello stadio di vita preparassitaria. *Estr. da DELPINO* 6: 3-22.
- PRADEL K.S., REZMER C., KRAUSGRILL S., RAUSCH T., ÜLLRICH 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., GRAVES J.D., STEWART G.R. 1990:** Physiology of the interaction of angiosperm parasites and their higher plant hosts. *Plant, Cell and Environment* 13: 91-104.
- RAJAGOPAL I., RAMASUBRAMANIAN T.S., PALIYATH G., MAHADEVAN S. 1988:** Hormones and *Cuscuta* development: Interaction of cytokinin and indole-3-acetic-acid in the growth and curvature of subapical stem segments. *J. Plant Growth Regul.* 7: 121-132.
- RAMASUBRAMANIAN T.S., PALIYATH G., RAJAGOPAL I., MAHESWARI R., MAHADEVAN S. 1988:** Hormones and *Cuscuta* development: In vitro induction of haustoria by cytokinin and its inhibition by other hormones. *J. Plant Growth Regul.* 7: 133-144.
- REVERS F., LE GALL O., CANDRESSE T., MAULE A.J. 1999:** New advances in understanding the molecular biology of plant/potyvirus interactions. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 12: 367-376.
- REYNOLDS E.S. 1963:** The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 17: 208-212.
- RIECHMANN J.L., LAIN S., GARCIA J.A. 1992:** Highlights and prospects of potyvirus molecular biology. *J. Gen. Virol.* 73: 1-16.
- ROBERTS A.G., SANTA CRUZ S., ROBERTS I.M., PRIOR D.A.M., TURGEON R., OPARKA K.J. 1997:** Phloem Unloading in Sink Leaves of *Nicotiana benthamiana*: Comparison of a Fluorescent Solute with a Fluorescent Virus. *Plant Cell* 9: 1381-1396.
- ROBERTS I.M., BOEVINK P., ROBERTS A.G., SAUER N., REICHEL C., OPARKA K.J. 2001:** Dynamic changes in the frequency and architecture of plasmodesmata during the sink-source transition in tobacco leaves. *Protoplasma* 218: 31-44.
- ROJAS M.R., ZERBINI F.M., ALLISON R.F., GILBERTSON R.L., LUCAS W.J. 1997:** Capsid protein and helper component-proteinase function as potyvirus cell-to-cell movement proteins. *Virology* 237: 283-295
- ROTHE K., DIETRICH B., RAHFELD B., LUCKNER M. 1999:** Uptake of phloem-specific cardenolides by *Cuscuta* sp. Growing on *Digitalis lanata* and *Digitalis purpurea*. *Phytochemistry* 51: 357-361.
- RUIZ-MEDRANO R., XOCONOSTLE-CAZARES B., LUCAS W.J. 2001:** The phloem as a conduit for interorgan communication. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4: 202-209.
- SAKUTH T., SCHOBERTS C., PECSVARADI A., EICHHOLZ A., KOMOR E., ORLICH G. 1993:** Specific proteins in the sieve-tube exudate of *Ricinus communis* L. seedlings: separation, characterization and in-vivo labelling. *Planta* 191: 207-213.
- SAMODELKIN P. 1990:** Erarbeitung eines Versuchssystems zur Untersuchung des Stoffübertritts zwischen Wirtspflanze und *Cuscuta reflexa* ROXB. Diplomarbeit, Sektion Biowissenschaften, Martin-Luther-Universität Halle.
- SANTA CRUZ S., ROBERT A.G., PRIOR D.A.M., CHAPMAN S., OPARKA K.J. 1998:** Cell-to-cell and phloem-mediated transport of potato virus X: the role of virions. *Plant Cell* 10: 495-510.
- SANTA CRUZ S. 1999:** Perspective: phloem transport of viruses and macromolecules - what goes in must come out. *Trends in Microbiology* 7: 237-241.

- SARIC M., KRSTIC B., MOMSILOVIC V. 1991:** The relationship of the concentration of mineral elements between host plant (*Pelargonium zonale*) and parasite (*Cuscuta reflexa* Roxb.). *Biochem. Physiol. Pflanzen* 187: 105-112.
- SCHAFFNER G. 1979:** Extraflorale Nektarien bei *Cuscuta*. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* 92: 721-729.
- SCHMALSTIG J.G., GEIGER D.R. 1985:** Phloem unloading in developing leaves of sugar beet. *Plant Physiol.* 79: 237-241.
- SCHMELZER K. 1956:** Beiträge zur Kenntnis der Übertragbarkeit von Viren durch *Cuscuta*-Arten. *Phytopath. Z.* 28: 1-56.
- SCHMUCKER TH. 1959:** Höhere Parasiten. In: W. Ruhland (Hsgb.) Handbuch der Pflanzenphysiologie Bd. 11, Heterotrophie. Springer: Berlin, Göttingen, Heidelberg. S. 480-529
- SCHOBERT C., BAKER L., SZEDERKENYI J., GROSSMANN P., KOMOR E., HAYASHI H., CHINO M., LUCAS W.J. 1998:** Identification of immunologically related proteins in sieve-tube exudates collected from monocotyledonous and dicotyledonous plants. *Planta* 206: 245-252.
- SCHOBERT C., GROSSMANN P., GOTTSCHALK M., KOMOR E., PECSVARADI A., ZUR NIEDEN U. 1995:** Sieve tube exudate from *Ricinus communis* contain ubiquitin and chaperones. *Planta* 196: 205-210.
- SCHOBERT C., GOTTSCHALK M., KOVAR D.R., STAIGER C.J., YOO B.-C., LUCAS W.J. 2000:** Characterization of *Ricinus communis* phloem profilin, RcPRO1. *Plant Mol. Biol.* 42: 719-730.
- SCHÖNING U., KOLLMANN R. 1995:** The function of phloem connections in regenerating in vitro-grafts. *Bot. Acta* 108: 56-62.
- SCHREIBER U., BILGER W., NEUBAUER C. 1994:** Chlorophyll fluorescence as a nonintrusive indicator for in vivo photosynthesis. In: Schulze, E-D., Caldwell, M.M. (eds.) *Ecophysiology of photosynthesis* 100: 49-70, Springer, Berlin.
- SCHULZ A. 1995:** Plasmodesmal widening accompanies the short-term increase in symplastic phloem unloading in pea root tips under osmotic stress. *Protoplasma* 188: 22-37.
- SCHULZ A. 2000:** Untersuchungen zum Wachstum und zum Kohlenhydrathaushalt von *Cuscuta reflexa* Roxb. während der Parasitierung von *Vicia faba*. Wissenschaftliche Hausarbeit zur Ersten Staatsprüfung, 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., HALBSGUTH W. 1938:** Über den Anschluss einiger höherer Parasiten an die Siebröhren der Wirtspflanzen. Ein Beitrag zum Plasmodesmenproblem. *Jahrb. Wiss. Bot.* 87: 324-355.
- SHELP B.J., SWANTON C.J., HALL J.C. 1992:** Glufosinate Phosphinotricin mobility in young soybean shoots. *J. Plant Physiol.* 139: 626-628.

- SHELP B.J., KITHEKA A.M., VANDERPOOL R.A., VAN CAUWENBERGHE O.R., SPIERS G.A. 1998:** Xylem-to-phloem transfer of boron in broccoli and lupine during early reproductive growth. *Physiol. Plant.* 104: 533-450.
- SHERMAN T.D., PETTIGREW W.T., VAUGHN K.C. 1999:** Structural and immunological characterization of the *Cuscuta pentagona* L. Chloroplast. *Plant Cell Physiol.* 40: 592-603.
- SHUKLA D.D., WARD C.W., BRUNT A.A. 1994:** The Potyviridae: 74-110. CAB Int., Wallington, UK.
- SIMON-BUELA L., GARCIA-ARENAL F. 1999:** Virus particles of cucumber green mottle mosaic tobamovirus move systemically in the phloem of infected cucumber plants. *Mol Plant Microbe Interact.* Feb.12(2): 112-118.
- SINGH M., SINGH D.V., MISRA P.C., TEWARI K.K., KRISHNAN P.S. 1968:** Biochemical aspects of parasitism by the angiosperm parasites: starch accumulation. *Physiol. Plant.* 21: 525-538.
- SJÖLUND R.D. 1997:** The phloem sieve element: A river runs through it. *Plant Cell* 9: 1137-1146.
- SMITH L.M., SABNIS D.D., JOHNSON R.P.C. 1987:** Immunochemical localisation of phloem lectin from *Cucurbita maxima* using peroxidase and colloidal-gold labels. *Planta* 170: 461-470.
- SPURR A.R. 1969:** A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J. Ultrastruct. Res.* 26: 31-43.
- SRIVASTAVA S., NIGHOJKAR A., KUMAR A. 1994:** Multiple forms of pectin methylesterase from *Cuscuta reflexa* filaments. *Phytochemistry* 37: 1233-1236.
- 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.
- SZEDERKENYI J., KOMOR E., SCHOBERT C. 1997:** Cloning of the cDNA for glutaredoxin, an abundant sieve-tube exudate protein from *Ricinus communis* L. and characterisation of the glutathione-dependent thiol-reduction system in sieve tubes. *Planta* 202: 349-356.
- TADA Y., SUGAI M., FURUHASHI K. 1996:** Haustoria of *Cuscuta japonica*, a holoparasite flowering plant, are induced by the cooperative effects of far-red light and tactile stimuli. *Plant Cell Physiol.* 37: 1049-1053.
- TERRY B.R., ROBARDS A.W. 1987:** Hydrodynamic radius alone governs the mobility of molecules through plasmodesmata. *Planta* 171: 145-157.
- TETLOW I.J., FARRAR J.F. 1993:** Apoplastic sugar concentration and pH in *Barley* leaves infected with *brown rust*. *J. Exp. Bot.* 44(262): 929-936.
- THOMPSON A.G., SCHULZ A. 1999:** Macromolecular trafficking in the phloem. *Trends Plant Sci.* 4(9): 354-360.
- TSIVION Y. 1978:** Loading of assimilates and some sugars into the translocation system of *Cuscuta*. *Aust. J. Plant Physiol.* 5: 851-857.

- TURGEON R. 1987:** Phloem unloading in tobacco sink leaves : Intensity to anoxia indicates a symplastic pathway. *Planta* 171: 73-81.
- TURGEON R. 1989:** The sink-source transition in leaves. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40: 119-138.
- TYREE M.T., PETERSON C.A., EDINGTON L.V. 1979:** A simple theory regarding ambimobility with special reference to the nematocide oxamyl. *Plant Physiol.* 63: 367-374.
- ULOTH W. 1860:** Beiträge zur Physiologie der Cuscuten. *Flora* 17 und 18.
- UNGER F. 1840:** Beiträge zur Kenntnis der parasitischen Pflanzen. Annalen des Wiener Museums der Naturgeschichte, Band II.
- URCUQUI-INCHIMA S., MAIA I.G., ARRUDA P., HAENNI A.L., BERNARDI F. 2000:** Deletion mapping of the potyviral helper component-proteinase reveals two regions involved in RNA binding. *Virology* 268: 104-111.
- VAN BEL A.J.E., KEMPERS R. 1991:** Symplastic isolation of the sieve element-companion cell complex in the phloem of *Ricinus communis* and *Salix alba* stems. *Planta* 183: 69-76.
- VAN BEL A.J.E. 1993:** Strategies of phloem loading. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 44: 253-281.
- VAN DER KOOLJ T.A.W., KRAUSE K., DÖRR I., KRUPINSKA K. 2000:** Molecular, functional and ultrastructural characterization of plastids from six species of the parasitic flowering plant genus *Cuscuta*. *Planta* 210: 701-707.
- VAN DIE J. 1963:** Pathway of translocation and metabolic conversions of root absorbed <sup>14</sup>C-(U)-L-glutamic acid in tomato plants. *Acta Bot. Neerl.* 12: 269-280.
- VAUGHN K.C. 2002:** Attachment of the parasitic weed dodder to the host. *Protoplasma* 219: 227-237.
- VAUGHN K.C. 2003:** Dodder hyphae invade the host: a structural and immunocytochemical characterization. *Protoplasma* 220: 189-200.
- WALLACE A., ROMNEY E.M., ALEXANDER G.V. 1978:** Mineral composition of *Cuscuta nevadensis* Johnston (dodder) in relationships to its host. *Plant Soil* 50: 227-231.
- WALZEL G. 1952:** *Cuscuta* auf *Nicotiana* nikotin-frei. *Phyton* (Horn) 4: 121-123.
- WANG H.L., OFFLER C.E., PATRICK J.W., 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., FISHER D.B. 1994:** The use of fluorescent tracers to characterize the post-phloem transport pathway in maternal tissues of developing wheat grains. *Plant Physiol.* 104: 17-27.
- WINK M., WITTE L. 1993:** Quinolizidine alkaloids in *Genista acanthoclada* and its holoparasite, *Cuscuta palaestina*. *J. Chem. Ecol.* 19: 441-448.
- WOLSWINKEL P. 1974a:** 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. 1974b:** Enhanced rate of  $^{14}\text{C}$ -solute release to the free space by the phloem of *Vicia faba* stems parasitised by *Cuscuta*. *Acta Bot. Neerl.* 23: 177-188.
- WOLSWINKEL P. 1975:** The active role of the host (*Vicia faba* L.) in the transfer of nutrient elements from the phloem to the parasite (*Cuscuta* species): Metabolically controlled  $\text{K}^+$  and  $\text{Mg}^{++}$  release to the free space. *Acta Bot. Neerl.* 24: 211-224.
- WOLSWINKEL P. 1977:** Physiological aspects of a parasitic relationship. The effect of *Cuscuta* on its host. Dissertation, Universität Utrecht.
- WOLSWINKEL P., AMERLAAN 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 acidic invertase. *J. Exp. Bot.* 34: 1516-1527.
- WRIGHT K.M., HOROBIN R.W., OPARKA K.J. 1996:** Phloem mobility of fluorescent xenobiotics in *Arabidopsis* in relation to their physicochemical properties. *J. Exp. Bot.* 47: 1779-1787.
- WRIGHT K.M., 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.
- XOCONOSTLE-CAZARES B., XIANG Y., RUIZ-MEDRANO R., WANG H.-L., MONZER J., YOO B.-C., MCFARLAND K.C., FRANCESCHI V.R., LUCAS W.J. 1999:** Plant paralog to viral movement protein that potentiates transport of mRNA into the phloem. *Science* 283: 94-98.
- XOCONOSTLE-CAZARES B., RUIZ-MEDRANO R., LUCAS W.J. 2000:** Proteolytic processing of CmPP36, a protein from the cytochrome  $b_5$  reductase family, is required for entry into the phloem translocation pathway. *Plant Journal* 24(6): 735-747.
- YANG F., MOSS L.G., PHILLIPS G.N. JR. 1996:** The molecular structure of the green fluorescent protein. *Nature Biotech.* 14: 1246-1251.
- ZIEGLER H. 1975:** Nature of transported substances. In: Encyclopaedia of Plant Physiology Vol.1: Transport in plants I. Phloem transport, Springer: Berlin, Heidelberg, New York, pp. 59-100.
- ZIMMERMANN C.E. 1962:** Autotrophic development of dodder (*Cuscuta pentagona* Engelm.) in vitro. *Crop. Sci.* 2: 449-450.

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich mich mit der vorliegenden Arbeit erstmals um die Erlangung des Doktorgrades bewerbe, 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 (Saale),

Mandy Birschwilks

## Danksagung

Mein besonderer Dank gebührt Frau Prof. St. Neumann für die Möglichkeit, an dem so faszinierenden wie auch einen zur Verzweiflung bringenden pflanzlichen Objekt zu arbeiten, für ihren unzerstörbaren Optimismus, für die Bereitschaft, Argumentationen kritischen Prüfungen zu unterziehen, für die Ermunterungen und vor allem für die schöne Zeit.

Herrn Prof. N. Sauer, Molekulare Pflanzenphysiologie der Universität Erlangen, möchte ich für die zur Verfügung gestellten GFP-exprimierenden *Arabidopsis*- und Tabakpflanzen sowie die anregenden Diskussionen danken.

Herrn Dr. J. Schmidt aus der Abteilung Naturstoffchemie des Institutes für Pflanzenbiochemie (IPB) möchte ich für die Identifizierung des Nicotins danken.

Herrn D. Hofius danke ich für die tatkräftige Unterstützung und hervorragende Zusammenarbeit bei den Virusexperimenten sowie Herrn Prof. U. Sonnewald vom IPK Gatersleben, der durch die Bereitstellung von Gewächshausfläche und Virus-Stamm die Experimente ermöglichte.

Weiterhin gilt mein Dank Frau B. Hause (IPB) für die Einführung in die konfokale *laser scanning* Mikroskopie sowie Herrn Dr. D. Neumann (IPB) für die Einarbeitung in die Techniken der Elektronenmikroskopie.

Gedankt sei an dieser Stelle auch allen Mitarbeitern des Institutes für Pflanzenphysiologie, die in irgendeiner Weise zum Entstehen der Arbeit beigetragen haben.

# Lebenslauf

## Persönliche Angaben

Name: Mandy Birschwilks  
Wohnort: 06114 Halle/Saale  
Strasse: Windthorststr. 15  
Geburtstag und -ort: 12.06.1975 in Potsdam-Babelsberg  
Nationalität: deutsch

## Schulbildung

09/1982 - 07/1990 allgemeinbildende POS „Walter-Wolf“ in Potsdam  
09/1990 - 07/1995 Humboldt-Gymnasium in Potsdam, Abitur

## Studium

10/1995 - 10/2000 Biologiestudium an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Fachbereich Biologie  
10/2000 Abschluss Diplombiologin, Note 1,3  
Thema der Diplomarbeit:  
„Untersuchungen zur Ernährungsweise isolierter Achsen der parasitischen Blütenpflanze *Cuscuta reflexa* Roxb.“, Note 1,1  
01.11.2000-31.07.2003 Doktorandin an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Fachbereich Biologie, Institut für Pflanzenphysiologie  
seit 01.08.2003 wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Pflanzenbiochemie, Halle (Saale)