

Aus dem Institut für Pflanzenernährung
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Prof. Dr. S. Schubert

Metabolitentransport im indeterminierten Leguminosenknöllchen

**Untersuchungen zu Struktur und Funktion der
Transportwege im Knöllchen von *Vicia faba* L.**

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Agrarwissenschaften
beim Fachbereich 09
- Agrarwissenschaften, Ökotoxologie und Umweltmanagement -
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
Edgar Peiter
aus Niedert / Hunsrück

2002

Tag der Disputation: 13.11.2002

Mitglieder der Prüfungskommission:

Vorsitzender: Herr Prof. Dr. Dr. h.c. W. Friedt

1. Gutachter: Herr Prof. Dr. S. Schubert

2. Gutachter: Herr Prof. Dr. K.-H. Kogel

Prüfer: Herr Prof. Dr. B. Honermeier

Prüfer: Herr Prof. Dr. Dr. h.c. H.-J. Jäger

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Bedeutung der symbiotischen N ₂ -Fixierung	1
1.2	Entwicklung und Aufbau des Knöllchens	2
1.2.1	Morphologie determinierter und indeterminierter Leguminosenknöllchen	3
1.2.2	Das indetermierte Wurzelknöllchen von <i>Vicia faba</i>	4
1.3	Stoffwechselprozesse im Leguminosenknöllchen	6
1.3.1	Stickstoffmetabolismus im Leguminosenknöllchen	6
1.3.2	Kohlenstoffmetabolismus im Leguminosenknöllchen	9
1.4	Kurzstreckentransport von Metaboliten im Leguminosenknöllchen	12
1.4.1	Stickstofftransport	13
1.4.2	Kohlenstofftransport	14
1.5	Import und Export von Metaboliten im Leguminosenknöllchen	15
1.5.1	Assimilatimport	15
1.5.2	Metabolitenexport	16
1.6	Bedeutung von Transportprozessen für die O ₂ -Versorgung im Leguminosenknöllchen	17
1.7	Bedeutung von Transportprozessen für die Einbindung der Knöllchenaktivität in den pflanzlichen Stoffwechsel	19
1.8	Ziele dieser Arbeit	22
2	Bakterienkultivierung und Pflanzenanzuchten	24
2.1	<i>Rhizobium</i> -Kulturen	24
2.1.1	Chemikalien	24
2.1.2	Stammhaltung und Flüssigkulturen	24
2.2	Pflanzenanzuchten	25
2.2.1	Chemikalien	25

2.2.2	Anzucht von <i>Vicia faba</i> in Bodenkultur	25
2.2.3	Anzucht von <i>Vicia faba</i> in Nährlösungskultur	26
2.2.4	Anzucht von <i>Glycine max</i> in Nährlösungskultur	28
3	Anatomische Rahmenbedingungen des Metabolitentransports	30
3.1	Zielsetzung	30
3.2	Material und Methoden	31
3.2.1	Chemikalien	31
3.2.2	Cryomikrotomie	31
3.2.3	Licht- und Fluoreszenzmikroskopie	32
3.2.4	Transmissionselektronenmikroskopie	33
3.3	Ergebnisse	33
3.3.1	Entwicklung apoplastischer Barrieren der Wurzel	34
3.3.2	Entwicklung der vasculären Endodermis des Knöllchens	34
3.3.3	Entwicklung der Knöllchenendodermis	39
3.3.4	Ultrastruktur von Zellwänden im Cortex des Knöllchens	40
3.3.4	Symplastische Kontinuitäten im Knöllchen	42
3.4	Diskussion	43
3.4.1	Die vasculäre Endodermis des Knöllchens	43
3.4.2	Die Knöllchenendodermis	46
3.4.3	Symplastische Kontinuitäten im Knöllchen	50
3.4.5	Die Rolle des äußeren Cortex	52
4	Isolation von Protoplasten aus dem Zentralgewebe des Knöllchens	54
4.1	Zielsetzung	54
4.2	Material und Methoden	55
4.2.1	Chemikalien	55

4.2.2	Erste Ansätze zur Isolation infizierter Protoplasten	56
4.2.3	Methode zur Isolation und Separation sphärischer infizierter und nicht-infizierter Protoplasten aus dem Knöllchen-Zentralgewebe	57
4.2.4	Quantifizierung der Protoplastenausbeute	63
4.2.5	Färbemethoden für Vitalitätstests und Stärkenachweis	63
4.2.6	Untersuchung der Struktur isolierter Protoplasten mittels Transmissionselektronenmikroskopie	64
4.2.7	Isolation von Protoplasten aus dem Zentralgewebe von <i>Glycine max</i> -Knöllchen	66
4.3	Ergebnisse	66
4.3.1	Erste Ansätze zur Isolation infizierter Protoplasten	66
4.3.2	Schritte zu einem neuen Protokoll zur Isolation und Separation sphärischer Protoplasten aus dem Knöllchen-Zentralgewebe	67
4.3.3	Einfluss des physiologischen Gewebeaters auf Isolation und Struktur infizierter Protoplasten	74
4.3.4	Vitalitätstests und Stärkenachweis	74
4.3.5	Separation verschiedener Protoplastentypen	79
4.3.6	Adhäsion und Agglutination von Protoplasten	82
4.3.7	Ultrastruktur infizierter <i>V. faba</i> -Protoplasten	83
4.3.8	Isolation von Protoplasten aus dem Zentralgewebe von <i>Glycine max</i> -Knöllchen	87
4.4	Diskussion	88
4.4.1	Ansätze zur Isolation infizierter Protoplasten aus dem Knöllchen-Zentralgewebe	88
4.4.2	Eine neue Methode zur Isolation und Separation von Protoplasten aus dem Knöllchen-Zentralgewebe	89
4.4.3	Eignung verschiedener Vitalitätstests zur Feststellung der Intaktheit infizierter Protoplasten	92
4.4.4	Ultrastrukturelle Besonderheiten infizierter Protoplasten aus dem Knöllchen-Zentralgewebe	94

5	Membrantransport von Zuckern und Aminosäuren im Knöllchen	98
5.1	Zielsetzung	98
5.2	Material und Methoden	99
5.2.1	Chemikalien	99
5.2.2	Inkubationsstudien mit Zentralgewebe	100
5.2.3	Protonenabgabe und Zuckeraufnahme durch nicht-sphärische infizierte „Protoplasten“	101
5.2.4	Protonenabgabe durch sphärische infizierte und nicht-infizierte Protoplasten	102
5.2.5	Aufnahme ¹⁴ C-markierter Metabolite durch sphärische infizierte und nicht-infizierte Protoplasten	103
5.2.6	Saccharosespaltung in Suspensionen infizierter und nicht-infizierter Protoplasten	107
5.3	Ergebnisse	107
5.3.1	Transportstudien mit Knöllchen-Zentralgewebe	107
5.3.2	Transportstudien mit Protoplasten	112
5.4	Diskussion	135
5.4.1	Membranintegrität der Protoplastenfraktionen	136
5.4.2	Nettoprotonenabgabe von Zentralgewebe und daraus isolierten infizierten und nicht-infizierten Protoplasten	136
5.4.3	Apoplastische Aminosäurebewegung im Knöllchen?	139
5.4.4	Apoplastische Zuckerbewegung im Knöllchen?	144
6	Implikationen der Transportwege - Abschließende Bemerkungen	154
6.1	Transportwege für Metabolite im Knöllchen	154
6.2	Metabolitentransport und Metabolismus	156
6.3	Metabolitentransport und Regulation der Knöllchenaktivität	159
7	Zusammenfassung	163

8	Anhang	167
8.1	Bezugsquellen für Chemikalien	167
8.2	Aus dieser Arbeit entstandene Veröffentlichungen	168
8.2.1	Artikel in begutachteten Zeitschriften	168
8.2.2	Artikel in Kongressbänden	168
8.2.3	Posterpräsentationen	169
8.2.4	Vorträge bei Kolloquien und Konferenzen	171
9	Literatur	173

In dieser Arbeit verwendete Abkürzungen

Asn	Asparagin
Asp	Aspartat
BSA	bovines Serumalbumin
Bq	Becquerel
CCCP	Carbonylcyanid m-chlorophenylhydrazon
DBP	Dibutylphthalat
DHP	Diisoheptylphthalat
DPM	Zerfälle pro Minute
ES	Enzymsuspension (für Protoplastenisolation)
FDA	Fluorescein-Diacetat
FM	Ficollmedium (für Protoplastenisolation)
FW	Frischmasse
Fru	Fructose
g	Gramm
Glc	Glucose
Gln	Glutamin
Glu	Glutamat
h	Stunde(n)
HEPES	N-(2-hydroxyethyl)-piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure)
iC	innerer Cortex des Knöllchens
IZ	infizierte Zelle(n) des Knöllchen-Zentralgewebes
J	Joule
L	Liter
Leu	Leucin
M	mol L ⁻¹
m	Meter
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
min	Minute(n)
MW	Molekulargewicht
NZ	nicht-infizierte Zelle(n) des Knöllchen-Zentralgewebes

oC	äußerer Cortex des Knöllchens
OsM	osmolal
PBM	Peribacteroidmembran
PE	Polyethylen
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCV	gepacktes Zellvolumen
PI	Propidiumjodid
PM	Plasmamembran
PS	Polystyrol
PWB	Protoplasten-Waschpuffer (für Protoplasten-TEM)
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde(n)
SM	Suspensionsmedium (für Protoplastenisolation)
Suc	Saccharose
TEM	Transmissionselektronenmikroskop(ie)
WM	Waschmedium (für Protoplastenisolation)

1 Einleitung

1.1 Bedeutung der symbiotischen N₂-Fixierung

Distickstoff (N₂) ist ein gasförmiges Molekül mit großer Stabilität, aus dem nur unter Aufwendung hoher Energie (ca. 1 MJ mol⁻¹) andere N-Verbindungen synthetisiert werden können (Falbe und Regitz 1995). Obwohl Stickstoff als Baustein von Aminosäuren für alle Organismen essentiell ist, sind (im Gegensatz zur photosynthetischen CO₂-Assimilation) höhere Pflanzen bis heute nicht in der Lage, N₂ zu reduzieren (fixieren). Diese Fähigkeit ist freilebenden, assoziativen und symbiotischen Bakterien vorbehalten. Die erste Stufe der Integration der bakteriellen N₂-Fixierung in den pflanzlichen Stoffwechsel stellt die Assoziation endophytischer N₂-fixierender Bakterien (z.B. *Azospirillum*, *Glucoacetobacter*) mit verschiedenen Gräsern (z.B. *Saccharum sp.*) dar (Hirsch et al. 2001). Andere Bakterien entwickelten komplexe Symbiosen mit Pflanzen, die in der Entstehung eines neuen Pflanzenorgans, dem (Wurzel-)Knöllchen, resultierten. Auf Entwicklungs- und Morphologieebene unterscheidbar sind die Symbiosen von Actinomyceten (*Frankia*) mit Actinorrhizapflanzen und von Rhizobien (*Mesorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*) mit Pflanzen der Ordnung Fabales (Leguminosae).

Die Symbiose von Rhizobien mit Leguminosen ist ökologisch und wirtschaftlich von großer Bedeutung. Bis zur großtechnischen Einführung der synthetischen N₂-Fixierung (z.B. nach Haber und Bosch; Falbe und Regitz 1995) trug sie (neben quantitativ weniger bedeutenden Quellen, wie N₂-Fixierung durch freilebende Bakterien und Blitzenladungen) entscheidend zum Ersatz des dem landwirtschaftlichen Produktionskreislauf entzogenen Stickstoffs bei. Dies gilt bis heute für „alternative“ Wirtschaftsweisen und Subsistenzlandwirtschaft. Unter gemäßigten Bedingungen kann beispielsweise eine Leguminosen-

Gründung über 100 kg N ha^{-1} für die Folgefrucht bereitstellen (Vance 2001). Die symbiotische N_2 -Fixierung ist dabei mit hohen Energiekosten von ca. 6 g assimiliertem C pro g fixiertem N (Minchin und Pate 1973, Vance und Heichel 1991) bzw. 25-50 mol ATP pro mol fixiertem N (Minchin et al. 1981) verbunden, was bis zu 30% der Photosyntheserate ausmachen kann (Almeida et al. 2000). Trotz dieses hohen Energiebedarfs wird meist keine Ertragssteigerung durch mineralische Stickstoffgaben zu N_2 -fixierenden Leguminosen erreicht (Scherer und Danzeisen 1980, Plies-Balzer et al. 1995). Dies weist auf eine effektive Integration des N_2 -fixierenden Bakteriums in den pflanzlichen Stoffwechsel hin, wobei Transportprozesse im Knöllchen eine entscheidende Rolle spielen könnten. Diese sind Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

1.2 Entwicklung und Aufbau des Knöllchens

Die Komplexität der Rhizobien-Leguminosen-Interaktion wird deutlich aus der Tatsache, dass mindestens je 50 Bakterien- und Pflanzengene in Nodulation und N_2 -Fixierung involviert sind (Vance 2001). Einige Pflanzengene (Noduline) sind knöllchenspezifisch und werden fast ausschließlich bei Knöllcheninitiierung, -entwicklung und -funktion exprimiert (Pawlowski 1997).

Das Leguminosenknöllchen kann von einer einzigen Rhizobienzelle initiiert werden (Hirsch 1996), die durch Chemoattraktantien (i.a. Flavonoide) zu einem Wurzelhaar gelenkt wurde und dort Nod-Faktoren (*N*-Acetylchitooligosaccharide) sekretiert (Hirsch 1992, Hirsch et al. 2001). Nanomolare Konzentrationen von Nod-Faktoren führen zur Deformation (Curling) des Wurzelhaars, in welches das Rhizobium mittels Endocytose eindringt (Newcomb et al. 1979). Durch Infektionsschläuche, d.h. von Plasmamembran umhüllte modifizierte Wirtszellwände, gelangen die Rhizobien

zu den Wirtszellen und werden in diese durch Endocytose entlassen. Dabei werden die Rhizobien von einer Peribacteroidmembran eingeschlossen, die aus der Plasmamembran entsteht (Newcomb 1976). Peribacteroidmembran und eingeschlossene Bacteroide bilden ein Symbiosom.

1.2.1 Morphologie determinierter und indeterminierter Leguminosenknöllchen

Während Wurzelknöllchen von Nichtleguminosen, wie z.B. Actinorrhiza-Knöllchen, modifizierte Seitenwurzeln mit zentralem Leitbündel darstellen (Pawlowski 1997), unterscheiden sich Leguminosenknöllchen hinsichtlich Initiierung (vgl. z.B. Newcomb et al. 1979 und Peterson und Lefcourt 1990) und Leitbündelanordnung (s.u.) deutlich von Wurzeln. Generell sind zwei wirtsdeterminierte Knöllchentypen unterscheidbar, die sich bereits bei ersten durch Nod-Faktoren ausgelösten Teilungen des Wurzelcortex identifizieren lassen (Hirsch 1992):

Bei Knöllchen des **determinierten** Wuchstyps, gebildet durch Phaseolae (z.B. *Glycine*, *Lotus*, *Phaseolus*, *Vigna*), finden erste Zellteilungen in der Hypodermis nahe des infizierten Wurzelhaares statt (Szczyglowski et al. 1998). Diese Zellen bilden das innere Knöllchengewebe. Aus späteren Zellteilungen in innerem Wurzelcortex und Perizykel gehen die inneren Cortexschichten (Parenchym) des Knöllchens hervor. Der äußere Cortex des Knöllchens entspringt dem Wurzelcortex. Bei diesem Knöllchentyp läuft das Entwicklungsprogramm aller Zellen von Differenzierung bis Seneszenz synchron ab. Die mitotische Aktivität wird früh eingestellt. Durch die gleichzeitige Entwicklung aller Zellen besitzen determinierte Knöllchen eine globuläre Form (Sprent 1980) und alle Zentralgewebezellen das gleiche physiologische Alter.

Indeterminierte Knöllchen werden von Viciae (z.B. *Cicer*, *Medicago*, *Pisum*, *Vicia*) gebildet (Sprent 1980). Dabei finden erste, antiklinale Zellteilungen im inneren Wurzelcortex gegenüber dem Protoxylem statt. Aus der meristematischen Zone gehen alle Gewebe des Knöllchens mit Ausnahme des äußeren Cortex hervor, der dem äußeren Wurzelcortex entstammt. Da das Knöllchenmeristem lange Zeit aktiv bleibt, sind indeterminierte Knöllchen häufig gestreckt keulenförmig. Alle Entwicklungsstufen von Infektion bis Seneszenz befinden sich in einem Knöllchen (z.B. Abd-Alla et al. 2000) und bilden einen Altersgradienten vom apikalen zum basalen Ende.

In beiden Knöllchentypen liegen die mit Rhizobien infizierten Zellen im Zentrum. Diese können vakuolisiert oder nicht-vakuolisiert sein (Brown und Walsh 1994). Im infizierten Zentralgewebe können sich außerdem nicht-infizierte Zellen befinden, was jedoch nicht obligatorisch ist (Brown und Walsh 1994). Auch in der Cortexanatomie unterscheiden sich Wurzelknöllchen verschiedener Arten sehr stark. Der Cortex determinierter Knöllchen von *Glycine max* setzt sich beispielsweise zusammen aus innerem Cortex (bestehend aus Verteilungszone und Grenzschicht), mittlerem Cortex (mit verdickten Zellwänden) und äußerem Cortex (mit großen, locker gepackten Zellen) (Minchin 1997). Der Cortex indeterminierter Knöllchen von *Vicia faba* L. (Ackerbohne), dem Untersuchungsobjekt der vorliegenden Studie, ist einfacher aufgebaut und wird im folgenden betrachtet.

1.2.2 Das indeterminierte Wurzelknöllchen von *Vicia faba*

Wie alle Leguminosenknöllchen bestehen auch jene von *V. faba* aus einem infizierten Zentralgewebe, das von einem Cortex eingeschlossen wird (Abb. I.1 A). Der Cortex ist zusammengesetzt aus einem locker angeordneten äußeren Teil und einem dicht gepackten inneren Teil (Abb. I.1 B). Dieser

besteht aus 3-5 Lagen kleinerer Zellen. Die Leitbündel zur Ver- und Entsorgung des Knöllchens verlaufen im inneren Cortex (Abb. I.1 C).

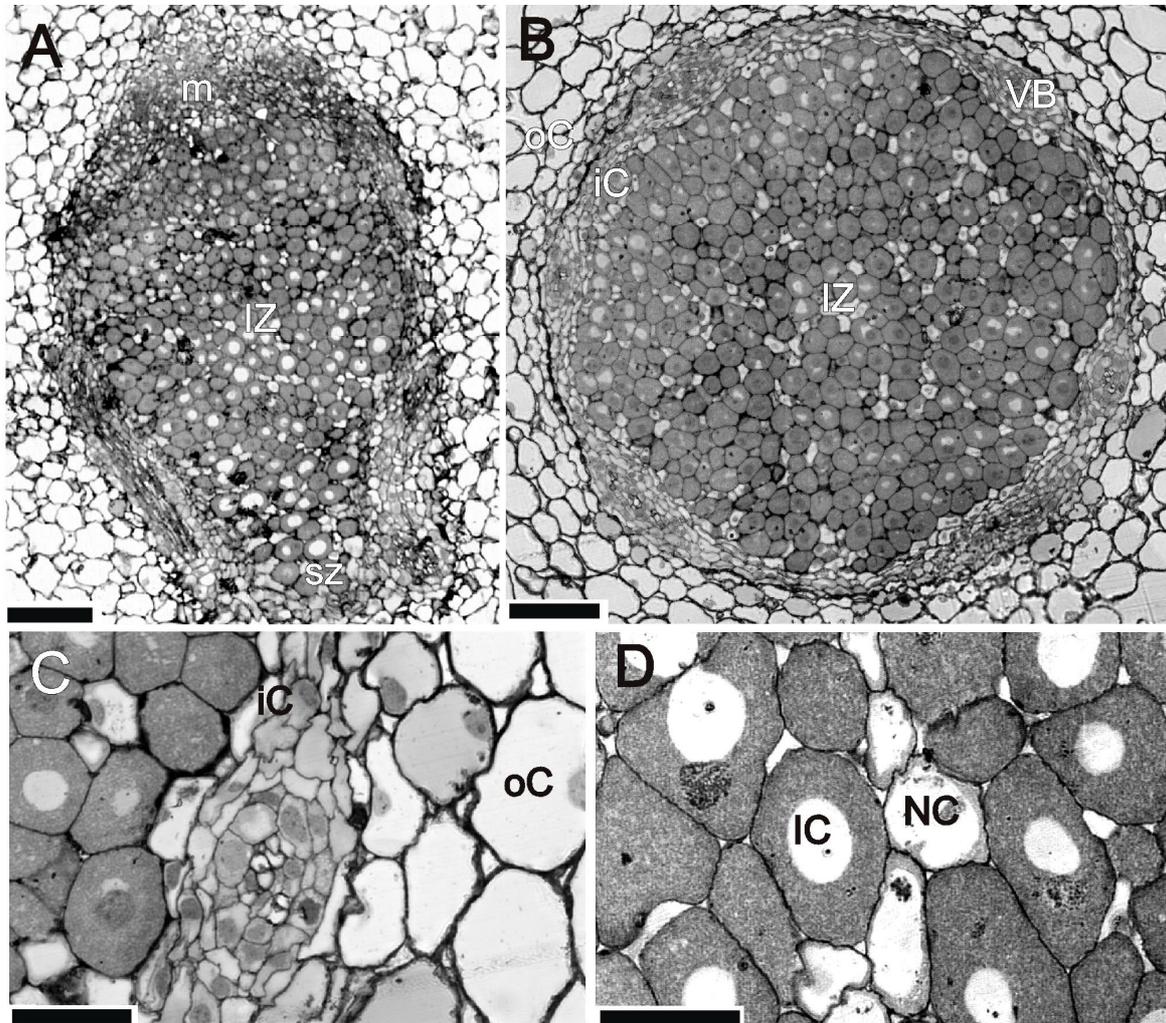


Abb. I.1. Hellfeldaufnahmen eines fünf Wochen alten *Vicia faba*-Knöllchens. **A.** Längsschnitt. Die infizierte Zone (IZ) wird von einem Cortex umgeben und entwickelt sich vom apikalen Meristem (m) zur basalen seneszenten Zone (sz). Balken: 200 μm . **B.** Querschnitt. Der Knöllchencortex besteht aus lockerem äußerem Cortex (oC) und dichtem innerem Cortex (iC) mit darin eingebetteten Leitbündeln (VB). Balken: 200 μm . **C.** Querschnitt durch ein Leitbündel. Balken: 50 μm . **D.** Band nicht-infizierter Zellen (NC) zwischen infizierten Zellen (IC) im Zentralgewebe. Balken: 50 μm . Abbildungen aus Abd-Alla et al. (2000).

Aufgrund des kontinuierlichen Wachstums sind im Zentralgewebe alle physiologischen Altersstadien gleichzeitig vorhanden (Abb. I.1 A). Die meisten infizierten Zellen bleiben bis zur Seneszenz vakuolisiert. Einige Zellen des Zentralgewebes werden nicht von Rhizobien infiziert. In Schnitten liegen diese nicht-infizierten Zellen verteilt im Gewebe und bilden in der Fokusebene häufig Aggregate oder kurze Bänder (Abb. I.1 D).

1.3 Stoffwechselprozesse im Leguminosenknöllchen

Die in den verschiedenen Kompartimenten des Knöllchens ablaufenden Stoffwechselforgänge bestimmen die zu transportierenden Metabolite und werden an dieser Stelle kurz dargestellt.

1.3.1 Stickstoffmetabolismus im Leguminosenknöllchen

1.3.1.1 N₂-Fixierung

Die zentrale Reaktion im Leguminosenknöllchen, die Reduktion von N₂ zu NH₃ wird durch den Enzymkomplex Nitrogenase in Bacteroiden bewerkstelligt. Dabei überträgt ein Fe-Protein Elektronen vom Donor auf ein MoFe-Protein, welches folgende Reaktion ausführt (Layzell und Moloney 1994):



Die Energie in Form von ATP wird durch Respiration von Dicarboxylaten erzeugt, die durch die Pflanze bereitgestellt werden (1.3.2.2). Im Zentralgewebe des indeterminierten Knöllchens wird die Nitrogenase-Untereinheit *nifH* nicht im gesamten infizierten Gewebe exprimiert, sondern nur in einer 5-15

Lagen breiten Zellschicht im apikalen Teil der „N₂-fixing zone“ (Trepp et al. 1999c). Daher findet auch nur in diesem Teil des Knöllchens und nicht in der gesamten infizierten Zone N₂-Fixierung statt. Dies ist von großer Bedeutung für Stoffflüsse im Knöllchen.

1.3.1.2 Stickstoffassimilation

Es wird davon ausgegangen, dass bei der N₂-Fixierung entstandenes NH₃ ohne Assimilation durch Bacteroide ins Wirtszellcytosol gelangt (Schubert 1986). Nach Waters et al. (1998) könnte jedoch Alanin (Ala) das Hauptexportprodukt aus Bacteroiden sein.

Im Wirtscytosol wird NH₃ durch **Glutaminsynthetase** (GS) in Glutamat (Glu) eingebaut. In indetermierten Knöllchen von *Medicago sativa* ist neben einer konstitutiv exprimierten GS-Isoform (GS100) eine knöllchenspezifische Isoform vorhanden (GS13), deren Expression mit der von Nitrogenase (1.3.1.1) colokalisiert ist (Trepp et al. 1999c). GS-Transkripte sind überwiegend auf infizierte Zellen beschränkt (Trepp et al. 1999c). Expression und Translation von GS sind nicht von NH₃-Akkumulation oder Nitrogenaseaktivität abhängig (Dunn et al. 1988, Gordon et al. 1997).

Durch Übertragung der Amidgruppe von Glutamin (Gln) auf 2-Oxoglutarat erzeugt **Glutamatsynthase** (NADH-GOGAT) zwei Moleküle Glu (das wiederum NH₃ binden kann, s.o.). Wie GS13 wird bei *M. sativa* auch NADH-GOGAT nur in der 5-15 Zellen breiten N₂-fixierenden Schicht des Knöllchens, und dort vornehmlich in infizierten Zellen, exprimiert (Trepp et al. 1999a, Trepp et al. 1999c). Die Nitrogenaseaktivität ist nicht Voraussetzung für die NADH-GOGAT-Expression (Trepp et al. 1999a). Das NADH-GOGAT-Protein wurde in Amyloplasten infizierter Zellen lokalisiert (Trepp et al. 1999b), wo NADH durch glycolytischen Stärkeabbau bereitgestellt werden kann.

Durch **Aspartat-Aminotransferase** (AAT) wird eine Aminogruppe von Glu auf Oxalacetat übertragen und damit Aspartat (Asp) und 2-Oxoglutarat erzeugt (Snapp und Vance 1986). In Knöllchen von *M. sativa* liegen die AAT-Isoformen AAT1 (cytosolisch) und AAT2 (plastidär) vor (Vance und Gantt 1992). AAT1 wird konstitutiv in nicht-infizierten Zellen von Zentralgewebe, Leitbündeln und innerem Cortex exprimiert (Yoshioka et al. 1999). Die AAT2-Expression im Knöllchen verläuft parallel mit der von NADH-GOGAT und PEPC und korreliert mit der Bacteroiddifferenzierung (Trepp et al. 1999c). Immunolokalisationen zeigten eine vierfach höhere AAT2-Proteinmenge in Plastiden infizierter Zellen im Vergleich zu nicht-infizierten Zellen (Yoshioka et al. 1999). AAT2 ist unmittelbar mit dem Amidexport verknüpft, da es in ureidexportierenden determinierten Knöllchen nur gering exprimiert wird (Vance und Gantt 1992).

Im indeterminierten Leguminosenknöllchen wird Asparagin (Asn), die wichtigste N-Exportform dieses Knöllchentyps, durch eine Gln-abhängige **Asparagin-Synthetase** (AS) aus Asp synthetisiert (Scott et al. 1976, Ta et al. 1986). Die AS-Expression in *M. sativa*-Knöllchen ist lokal weniger eng begrenzt als die von GS, GOGAT und AAT. Trotz höherer Expression im aktiv N₂-fixierenden Teil sind AS-Transkripte im gesamten Zentralgewebe außer der Invasionszone und im Cortex vorhanden (Trepp et al. 1999c).

Die Abhängigkeit der Asn-Produktion im indeterminierten Knöllchen von GS-, GOGAT-, AS- und AAT-Aktivitäten wurde auch durch Inhibitorstudien belegt (Snapp und Vance 1986). Die Expressionsmuster und Immunolokalisationen dieser Enzyme legen den Schluss nahe, dass die NH₃-Assimilation überwiegend in infizierten Zellen stattfindet. Diese Zellen exportieren den fixierten Stickstoff in Form von Aminoverbindungen. Im determinierten Leguminosenknöllchen werden mittels oxidativem Purinabbau Ureide (Allantoin, Allantoinsäure) synthetisiert (Schubert 1986), die die N-Transportformen aus

diesem Knöllchentyp darstellen. Die *de novo* Purinsynthese läuft im Plastid infizierter Zellen ab, die Ureidsynthese in nicht-infizierten Zellen (Shelp et al. 1983). Auf die komplexe Enzymatik der Ureidproduktion wird hier nicht eingegangen, da sie nur in determinierten Knöllchen vorkommt.

1.3.2 Kohlenstoffmetabolismus im Leguminosenknöllchen

1.3.2.1 Saccharosespaltung

Zur Bereitstellung von Energie und C-Skeletten für die N₂-Fixierung werden determinierte und indeterminierte Leguminosenknöllchen mit sprossbürtiger Saccharose versorgt (Streeter 1995). Diese könnte entweder durch saure oder alkalische Invertasen in Glucose und Fructose oder durch Saccharose-synthase in UDP-Glucose und Fructose gespalten werden. In Bacteroiden sind keine saccharosespaltenden Enzyme vorhanden (Streeter 1995).

Im Gegensatz zu Wurzeln wird in Knöllchen meist nur sehr geringe (Streeter 1982, Morell und Copeland 1984, Kouchi et al. 1988) oder keine Aktivität (Robertson und Taylor 1973) **saurer Invertasen** gefunden. Diese ist außerdem im äußeren Cortex lokalisiert (Kouchi et al. 1988) und spielt damit für die N₂-Fixierung wahrscheinlich keine Rolle. Alkalische Invertasen und Saccharosesynthasen liegen in Cytosol von Cortex und Zentralgewebe des Knöllchens vor, wobei die Aktivität beider Enzyme im Zentralgewebe wesentlich höher ist (Gordon 1991).

Aktivitäts- und Expressionsmuster der **alkalischen Invertase** sind wenig untersucht. Fehlende Saccharosesynthaseaktivität im indetermierten Knöllchen kann nicht durch alkalische Invertase kompensiert werden und führt zu reduzierten Aktivitäten nachgeschalteter Enzyme und Hemmung der

Nitrogenase (Gordon et al. 1999). Ferner bleibt während der Entwicklung determinierter Knöllchen die Aktivität alkalischer Invertase relativ konstant, während die Saccharosesynthaseaktivität zunächst ansteigt (Morell und Copeland 1984) und in alten Knöllchen wieder abfällt (Kavroulakis et al. 2000).

Aktivität und Expression der **Saccharosesynthase** sind in Knöllchen vielfach höher als in Wurzeln. Aufgrund niedriger Fructosekonzentrationen im Knöllchen arbeitet dieses Enzym dort nicht synthetisierend, sondern spaltend (Morell und Copeland 1985). Es handelt sich dabei um knöllchenspezifische Isoformen, wie z.B. GmNod100 (Gordon et al. 1992) oder VfNod93 (Küster et al. 1993). Immunolokalisationen zeigen eine geringere Saccharosesynthase-Proteinmenge im inneren Cortex als im Zentralgewebe und dort eine drei- bis vierfach höhere Proteinmenge in nicht-infizierten Zellen als in infizierten Zellen (Gordon et al. 1992, Zammit und Copeland 1993, Gordon et al. 1995). Diese Verteilung des Saccharosesynthase-Proteins ist bei determinierten Knöllchen von *G. max* (Gordon et al. 1992) und indetermierten Knöllchen von *Trifolium repens* (Gordon et al. 1995) ähnlich. Bei Stress (z.B. Dürre, Salz) werden parallel zur N₂-Fixierungsaktivität auch Expression und Aktivität der Saccharosesynthase stark reduziert (Gordon et al. 1997, Serraj et al. 1999a). Dies weist auf eine Kopplung von N₂-Fixierung (in infizierten Zellen) und Saccharosesynthaseaktivität (in nicht-infizierten Zellen) hin.

Aufgrund der Aktivitäts- und Proteinverteilung der Saccharosesynthase scheinen nicht-infizierte Zellen eine zentrale Rolle beim Abbau von Saccharose einzunehmen, deren Spaltprodukte zu infizierten Zellen transportiert werden müssten.

1.3.2.2 Weiterer Kohlenstoffmetabolismus

Zur weiteren Metabolisierung von aus der Saccharosespaltung entstandener Fructose, Glucose und UDP-Glucose sind in der Pflanzenfraktion des Knöllchens alle Enzyme für Glycolyse, Pentosephosphatweg und Stärkesynthese vorhanden (Copeland et al. 1989). Stärke wird in peripher gelegenen Amyloplasten nicht-infizierter und (nur bei indeterminierten Knöllchen) infizierter Zellen des Zentralgewebes abgelagert (z.B. Roughley et al. 1976a, Abd-Alla et al. 2000) und stellt einen osmotisch inaktiven Zwischenspeicher dar (Streeter 1995). Die Knöllchenstärke wird jedoch erst verwendet, wenn im Spross keine Stärke mehr mobilisiert werden kann (Vance und Heichel 1991). Stärkeakkumulation und Nitrogenaseaktivität sind interessanterweise positiv korreliert. Hemmung der Nitrogenaseaktivität durch Nitrat, Dürrestress (Gordon et al. 1997), Phosphatmangel (Almeida et al. 2000) oder Entfernung der Sprossmeristeme (Oti-Boateng et al. 1994) führten immer zu reduzierter Stärke-, aber erhöhter Saccharosekonzentration im Knöllchen.

Die aus Stärke und Saccharose entstandenen Zucker(-phosphate) könnten die konventionelle Glycolyse zu Pyruvat durchlaufen und im Tricarbonsäurezyklus weiter zu organischen Säuren (Citrat, Succinat, Malat) oxidiert werden. Alternativ wurde vorgeschlagen, dass unter hypoxischen Bedingungen des Knöllchens die Glycolyse bis zum Phosphoenolpyruvat (PEP) durchlaufen wird, welches mittels PEP-Carboxylase (PEPC) zu Oxalacetat carboxyliert wird (Vance und Heichel 1991). In Übereinstimmung damit werden im Cytosol des Knöllchen-Zentralgewebes sehr hohe PEPC-Aktivitäten gefunden (Gordon 1991). Oxalacetat kann mittels Malatdehydrogenase (MDH) zu Malat reduziert werden. In Übereinstimmung mit dem vorgeschlagenen reduktiven Weg der C_4 -Synthese liegen Malat, Succinat und Fumarat in wesentlich höheren Mengen vor als andere Säuren des Tricarbonsäurezyklus (Vance und Heichel 1991).

Während freilebende Rhizobien Zucker, Zuckeralkohole und organische Säuren verwerten (Hirsch 1996), stellen für symbiotische Bacteroide C₄-Dicarboxylate (Malat, Succinat) die Hauptenergieform dar (Vance und Heichel 1991, Streeter 1995). Mittels Malatenzym (ME) wird in Bacteroiden aus Malat Pyruvat gebildet (Udvardi und Day 1997). Daneben wurde gezeigt, dass Knöllchen von *V. faba* hohe Oxalatkonzentrationen enthalten und Oxalat die Nitrogenaseaktivität von Bacteroiden aus *V. faba*, aber nicht aus *Phaseolus vulgaris* oder *G. max* stimuliert (Trinchant et al. 1994). Bacteroide aus *V. faba* waren außerdem in der Lage, Glucose aufzunehmen und zu metabolisieren (Guérin et al. 1990), während solche aus *G. max* Glucose nicht über Glycolyse oder oxidativen Pentosephosphatweg abbauen konnten (Reibach und Streeter 1983). In *Bradyrhizobium*-Bacteroiden, z.B. aus *P. vulgaris* (Herrada et al. 1989, Matamoros et al. 1999), könnte in Granula abgelagertes Polyhydroxybutyrat als C-Speicherform dienen (Streeter 1995), während bei *Rhizobium*-Bacteroiden, z.B. aus *V. faba* (Trinchant et al. 1994) oder *Pisum sativum* (Matamoros et al. 1999), dagegen meist kein Polyhydroxybutyrat gefunden wurde.

1.4 Kurzstreckentransport von Metaboliten im Leguminosenknöllchen

Stoffwechselprozesse des Knöllchens laufen in verschiedenen Kompartimenten (Symbiosom, Plastid, Cytosol) verschiedener Zelltypen (nicht-infiziert, infiziert) in verschiedenen Geweben (Cortex, Zentralgewebe) ab. Die Metabolite müssen daher an mehreren Stellen Membranen passieren. Diese Prozesse sind (mit Ausnahme von Bacteroid- und Peribacteroidmembran)

wenig untersucht. Für Transportprozesse über Plasmamembranen indeterminierter Knöllchen liegen keinerlei Untersuchungen vor.

1.4.1 Stickstofftransport

Für die (neuerdings angezweifelte; 1.3.1.1) Abgabe von NH_3 aus Symbiosomen wird angenommen, dass dieses über die Bacteroidmembran in den Peribacteroidraum diffundiert, dort protoniert wird und als NH_4^+ über die Peribacteroidmembran (PBM; 1.2.1) gelangt (Whitehead et al. 1995). Das ist möglich durch Unterdrückung des bakteriellen NH_4^+ -Transporters (*Amt*) (Udvardi und Day 1997) und Expression eines Kanals für einwertige Kationen in der PBM (Kaiser et al. 1998). Bisher wurde vermutet, dass kein Aminosäureexport über die PBM stattfindet. Mittels Vesikelstudien konnte jedoch ein H^+ -Asp-Cotransport in Cytosolrichtung identifiziert werden (Rudbeck et al. 1999), der die postulierte Alaninabgabe (Waters et al. 1998) ermöglichen könnte. Außerdem geben Symbiosome in Langzeitstudien neben NH_4^+ auch Aminosäuren ab (Whitehead et al. 1995).

Die Aufnahme von Stickstoffverbindungen in Bacteroide wird durch die PBM begrenzt. Bacteroide nehmen zwar Aminosäuren (insbesondere Glu, Udvardi et al. 1990) auf, es findet jedoch kein Transport über die PBM statt (Herrada et al. 1989, Whitehead et al. 1995, Udvardi und Day 1997). In Aufnahmeexperimenten betrug die Aufnahmerate aller Aminosäuren in Symbiosome weniger als 10% der Succinataufnahmerate (Udvardi et al. 1990). Damit hält die PBM Aminosäuren von Bacteroiden fern. Es gibt allerdings noch keine Untersuchungen über den Aminosäuretransport in Symbiosome vor Einsetzen der N_2 -Fixierung.

1.4.2 Kohlenstofftransport

In vielen Untersuchungen konnten Bacteroide Hexosen und Disaccharide weder transportieren noch metabolisieren (1.3.2.2; Udvardi und Day 1997). Sie besitzen jedoch einen hochaffinen H⁺-Dicarboxylat-Symporter (*dctA*), dessen Aktivität für die N₂-Fixierungsrate nicht limitierend ist (Herrada et al. 1989, Udvardi und Day 1997). *Rhizobium*-Bacteroide aus *V. faba* nahmen auch Oxalat auf (Trinchant et al. 1994). Die Aufnahme von Zuckern durch Bacteroide wurde in einigen Fällen gezeigt. Bacteroide aus *P. vulgaris* (Herrada et al. 1989) und *V. faba* (Trinchant et al. 1994) nahmen Glucose auf, während solche aus *G. max* keine Glucose und Saccharose, dafür aber Fructose akkumulierten (Udvardi et al. 1990).

Die Verfügbarkeit verschiedener C-Formen für Bacteroide wird durch die sie umgebende PBM bestimmt. Intakte Symbiosome nehmen Succinat schnell und mit hoher Affinität auf (Udvardi et al. 1990). Ein spezifisch in der PBM vorhandenes Protein, Nod-26, stellt wahrscheinlich einen Anionenkanal dar, der den Transport von Dicarboxylaten (Malat, Succinat) durch die Membran bewerkstelligen könnte (Streeter 1995, Udvardi und Day 1997). Die Zuckeraufnahme in Symbiosome erfolgt dagegen meist auf sehr niedrigem Niveau durch passive Diffusion (Udvardi et al. 1990). Damit findet die in *in vitro* mögliche Fructoseaufnahme durch Bacteroide (s.o.) *in vivo* wahrscheinlich nicht statt. Symbiosome von *P. vulgaris* akkumulierten jedoch auch Glucose mit einer Sättigungskinetik (Herrada et al. 1989). Die Nutzbarkeit von cytosolischen Zuckern durch Bacteroide ist daher nicht völlig klar.

1.5 Import und Export von Metaboliten im Leguminosenknöllchen

1.5.1 Assimilatimport

Die Versorgung des Leguminosenknöllchens mit Saccharose erfolgt über das Phloem (Walsh et al. 1989a). Dieses ist Bestandteil des peripher gelegenen Leitbündelnetzwerks des Knöllchens (1.2). Daher muss die importierte Saccharose etliche Zellschichten überwinden, um ins Zentrum der infizierten Zone zu gelangen. Generell scheint der symplastische Weg (von Zelle zu Zelle über Plasmodesmen) die häufigste Art der Phloementladung zu sein (Patrick 1997). Dabei kann der plasmodesmische Transport, der über Diffusion oder Massenfluss funktionieren kann, limitierend sein. Ein apoplastischer Schritt (d.h. Entladung in die Zellwand) kommt in speziellen Situationen vor, wie z.B. bei Akkumulation osmotisch aktiver Substanzen (Patrick 1997).

Da Leibündel des *G. max*-Knöllchens von einer Endodermis umgeben sind, vermuten Brown et al. (1995) einen symplastischen Assimilattransport zur infizierten Zelle, was durch Translokationsstudien mit dem Tracer Lucifer Yellow CH untermauert wurde. In späteren Studien wurde jedoch gefunden, dass dieser Farbstoff unter Umständen die Plasmamembran passieren kann (Brown et al. 1997). In den in vorliegender Arbeit betrachteten Knöllchen von *V. faba* liegen aufgrund des indeterminierten Wachstums (1.2) unterschiedliche Alterstufen der Leitbündelendodermis nebeneinander vor, so dass über den Modus der Phloementladung in diesem Typ noch keine klaren Aussagen gemacht werden können.

Viele Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Anlieferung von Kohlenhydraten über das Phloem nicht limitierend für die N₂-Fixierung ist (Schubert 1995): So war die Nitrogenaseaktivität bei erhöhter Photosyntheserate (*G. max*; Parsons et al. 1993a) oder Besprühen des Sprosses mit Saccharose (*P. vulgaris*;

Becher et al. 1997) nicht erhöht. Durch $^{11}\text{CO}_2$ -Begasung des Sprosses konnte gezeigt werden, dass bei Hemmung der N_2 -Fixierung durch 5 mM NO_3^- die Partitionierung und Transitzeit von Photoassimilaten zu Knöllchen nicht reduziert war (*G. max*; Thorpe et al. 1998). Ferner nahm durch Schattierung des Sprosses der ^{11}C -Assimilatfluss um 80%, die Nitrogenaseaktivität jedoch nur um 20% ab (*G. max*; Walsh et al. 1998a). Große Fluktuationen der Saccharosezufuhr spiegeln sich damit nicht in der N_2 -Fixierung wider; die Assimilattranslokation ist nicht limitierend. *Vice versa* wirkte auch die Rate der N_2 -Fixierung nicht regulierend auf den Assimilatimportrate: Selbst eine komplette Hemmung der N_2 -Fixierung durch Ar:O_2 -Begasung der Knöllchen änderte die Assimilatpartitionierung zu nodulierten Wurzeln nicht (*G. max*; Walsh et al. 1998b).

1.5.2 Metabolitenexport

Indeterminierte Knöllchen exportieren assimilierten Stickstoff hauptsächlich in Form von Asn (Pate et al. 1979), jedoch zeigten $^{15}\text{N}_2$ -Markierungsstudien, dass auch andere Aminosäuren in geringen Mengen exportiert werden (Parsons und Baker 1996). Asn besitzt als N-Transportform einige Vorteile (Sieciechowicz et al. 1988): Es hat ein niedriges C:N-Verhältnis, ist löslicher als Ureide (löslich bis 30 mM) und stabiler als Gln. Daher ist Asn bei vielen Arten (auch Nichtleguminosen) die Hauptaminosäure in Xylem- und Phloemsaft. Der Export von Ureiden (1.3.1.2) wird in dieser Arbeit nicht besprochen, da er nur bei determinierten Knöllchen vorkommt (McClure und Israel 1979).

Der Export aus dem Knöllchen findet durch das in peripheren Leitbündeln gelegene Xylem statt (Walsh et al. 1989b). Daher müssen im Zentralgewebe assimilierte, zum Export bestimmte N-Verbindungen viele Zellschichten

überwinden. Wie für den Assimilatimport beschrieben, könnte dieser Transport apoplastische und/oder symplastische Schritte umfassen (Schubert 1995).

1.6 Bedeutung von Transportprozessen für die O₂-Versorgung im Leguminosenknöllchen

Im Knöllchen laufen zwei scheinbar inkompatible Prozesse ab: Auf hohem Niveau ablaufende Respiration und durch O₂-empfindliche Nitrogenase katalysierte N₂-Fixierung. Außerdem werden essentielle Gene (*nif*, *fix*) nur unter hypoxischen Bedingungen exprimiert (Minchin 1997). Die freie O₂-Konzentration im Knöllchen beträgt nur 5-60 nM (Thumfort et al. 1994). Zur Aufrechterhaltung eines niedrigen O₂-Partialdrucks (pO₂) ist im Knöllchen ein mehrstufiges System vorhanden (Vance und Heichel 1991): Atmosphärisches O₂ wird vom infizierten Zentralgewebe des Knöllchens durch eine physikalische Barriere größtenteils abgeschirmt und gelangt nach deren Permeation durch Interzellularräume an die infizierte Zelle. Nach dem Übertritt ins Cytoplasma wird O₂ entweder an Leghämoglobin gebunden (Appleby 1984) oder in Mitochondrien veratmet, die sich unmittelbar an Interzellularen befinden. Durch deren hohe Atmungsaktivität (55-60% der Knöllchenatmung) verringern sie die in die Zelle eindringende O₂-Menge (Bergersen 1997). Im Cytosol der infizierten Zelle puffert Leghämoglobin die freie O₂-Konzentration bei für die Nitrogenase optimalen, sehr niedrigen Werten (Bergersen und Turner 1975).

Mikroelektrodenmessungen zeigten, dass der pO₂ im Knöllcheninnern wesentlich geringer ist als im äußeren Cortex (Witty et al. 1987). Es wurde daher postuliert, dass im inneren Cortex des Knöllchens eine Gasdiffusionsbarriere existiert (Hunt und Layzell 1993). Unterschiedlicher O₂-Bedarf im Knöllchen macht eine Regulierbarkeit dieser Barriere erforderlich und viele

Untersuchungen sprechen dafür, dass sie nicht statisch, sondern in Grenzen variabel ist. So ändern sich bei langsamer Steigerung des externen pO_2 Aktivitäten von Atmung und Nitrogenase nicht, während ein O_2 -Schock die Nitrogenase im intakten Knöllchen irreversibel schädigt (Sheehy et al. 1983). Eine Reihe von Arbeiten zeigte, dass der Diffusionswiderstand nicht nur bei erhöhtem pO_2 (Serraj et al. 1995), sondern auch vielfältigen anderen Störungen steigt, wie Dürre- und Salzstress (Gordon et al. 1997) oder Abzupfen des Knöllchens (Ralston und Imsande 1982).

Die Wirkungsweise der variablen Barriere dürfte auf einer Veränderung gasgefüllter Interzellularen beruhen. Bei *Lupinus albus* löst Stress eine Akkumulation von Glycoprotein in Interzellularen des inneren Cortex aus (de Lorenzo et al. 1993, Iannetta et al. 1993). Verbreiteter scheint eine Modulation der Barriere durch Formänderung innerer Cortexzellen zu sein. Kollabieren dieser Zellen infolge eines Turgorabfalls verringert die Interzellularenweite (Hunt und Layzell 1993). Dieses Verhalten wurde z.T. mikroskopisch beobachtet (Witty et al. 1987, Serraj et al. 1995) und würde durch Veränderungen der Konzentration osmotisch aktiver Stoffe in Sym- und Apoplast reguliert, wie dies in stomatären Schließzellen der Fall ist. Es ist jedoch unbekannt, ob alle Zellen des inneren Cortex diese Funktionen übernehmen können, oder ob es lokale, regulierbare „Gaseintrittsorte“ gibt.

Es gibt Hinweise, dass die physikalische Gasdiffusionsbarriere nicht alleine im Cortex lokalisiert ist. So führte bei *M. sativa* eine Dekapitierung des Sprosses zu einem erhöhten Gasdiffusionswiderstand im Knöllchen, der aber nicht durch Veränderung der Interzellularenweite im inneren Cortex verursacht wurde (Weisbach et al. 1999). Ferner fanden van Cauwenberghe et al. (1994) bei *G. max*-Knöllchen unter erhöhtem atmosphärischem pO_2 in keinem Gewebe Veränderungen von Okklusion, Anzahl oder Fläche der Interzellularen. In Cortex und Zentralgewebe änderte sich jedoch die Form der Interzellularen, so

dass eine kleinere Fläche der Plasmamembran an den luftgefüllten Raum grenzte. Dies verlangsamt die O_2 -Diffusion in die infizierte Zelle (Thumfort et al. 1994). Die Änderung der Interzellularenform wird wahrscheinlich durch Turgoränderung angrenzender Zellen verursacht, wobei Transportprozesse über die Plasmamembran infizierter Zellen eine Rolle spielen könnten.

1.7 Bedeutung von Transportprozessen für die Einbindung der Knöllchenaktivität in den pflanzlichen Stoffwechsel

Pflanzen nehmen Mineralstoffe größtenteils über die Wurzel auf. Zur Anpassung der Aufnahmesysteme an den Sprossbedarf muss der Wurzel dessen Versorgungszustand signalisiert werden. Für mehrere Elemente (K, P, Fe, N, S) gibt es Hinweise, dass aus dem Spross (über das Phloem) in die Wurzeln rückverlagerte Nährstoffe oder deren Metabolite dieses Signal darstellen (Marschner et al. 1997). Nitratstickstoff wird beispielsweise in Wurzeln oder Spross assimiliert und in Form von Aminosäuren zu 10-60% in die Wurzeln rückverlagert (Peuke und Kaiser 1997). Daher stellen Aminosäuren wahrscheinlich das Signal des N-Status des Sprosses dar (Muller und Touraine 1992). Split-Root-Versuche mit $^{15}NO_3^-$ zeigten, dass die rückverlagerten Aminosäuren größtenteils nicht ins umliegende Gewebe eintreten, sondern vom Phloem ins Xylem übergehen und wieder in den Spross verlagert werden (Cooper und Clarkson 1989). Der cyclierende Amino-N-Pool im Leitgewebe könnte einen Puffer darstellen, der Spross- und Wurzelbedarf integriert.

Da auch die N_2 -Fixierungsaktivität der Knöllchen an einen wechselnden Gesamtpflanzenbedarf angepasst werden kann (Schubert 1995), liegt es nahe, dass diese durch aus dem Spross rückverlagerte Aminosäuren beeinflusst wird. Diese Feedbackhypothese der N_2 -Fixierung wurde von Parsons et al. (1993a) postuliert und durch viele Ergebnisse erhärtet. So stammt ein großer Teil der aus dem Knöllchen exportierten Aminosäuren nicht aus der N_2 -Fixierung, sondern aus Phloemimport und wird im Knöllchen rezykliert. Parsons und Baker (1996) fanden, dass 38-56% des Phloem-N durch das Knöllchen geleitet werden. Ferner geht eine durch Hemmung des Sprosswachstums reduzierte Nitrogenaseaktivität meist mit erhöhten Aminosäurekonzentrationen in Spross und Wurzel einher, z.B. bei Dürrestress (Schubert 1995, Schubert et al. 1995, Gordon et al. 1997), Phosphatmangel (Almeida et al. 2000), Entblätterung (Hartwig et al. 1994) oder Entfernung der Sprossmeristeme (Oti-Boateng et al. 1994). Auch bei Hemmung der N_2 -Fixierung durch Nitratangebot werden höhere Aminosäurekonzentrationen in der Pflanze gefunden (Parsons et al. 1993b, Bacanamwo und Harper 1997). Die erhöhten Gewebekonzentrationen an reduziertem N spiegeln sich in der Zusammensetzung von Xylem- und Phloemsaft wider (Hartwig und Trommler 2001). Die feedbackregulierende Wirkung erhöhter Aminosäurekonzentrationen im Leitgewebe wurde durch Aufnahme von Asn in abgeschnittene Wurzeln demonstriert (Oti-Boateng und Silsbury 1993).

Akkumulation von Aminosäuren im Leitgewebe infolge verschiedener Behandlungen ist oft mit erhöhten Konzentrationen einzelner Aminosäuren (Asn, Gln) im Knöllchen verbunden (Parsons et al. 1993b, Bacanamwo und Harper 1997), die Nitrogenaseaktivität ist jedoch meist nicht mit der Aminosäure-Gesamtkonzentration im Knöllchen korreliert (Streeter 1987, Blumenthal et al. 1997, Bacanamwo und Harper 1997). Auch direkt in abgeschnittene Wurzeln eingespeistes ^{14}C -Asn akkumulierte nur zu 2-3% im Knöllchen (Oti-Boateng und Silsbury 1993). Diese Daten sprechen dafür, dass

der Austausch des in Xylem und Phloem zyklierenden Amino-N-Pools mit dem umliegenden Knöllchengewebe begrenzt ist.

Es ist derzeit unklar, wie der Feedbackmechanismus der N_2 -Fixierung funktioniert. Da bei gehemmter Nitrogenaseaktivität meist auch der Gasdiffusionswiderstand erhöht ist (1.6), wurde ursprünglich von einer direkten Aminosäurewirkung auf die Diffusionsbarriere ausgegangen (Parsons et al. 1993a). Einige Arbeiten sprechen jedoch gegen diesen Mechanismus: Befinden sich die Knöllchen in $Ar:O_2$ -Atmosphäre, so induziert Entblätterung des Sprosses einen Rückgang der Nitrogenaseaktivität, aber keine Erhöhung des Gasdiffusionswiderstandes (Heim et al. 1993). Ferner kann eine durch Wasserstress gehemmte Nitrogenaseaktivität durch Erhöhung der atmosphärischen Sauerstoffkonzentration nur teilweise wiederhergestellt werden (Guérin et al. 1990).

Bei einem Reimport rezyklierter Aminosäuren ins Zentralgewebe wäre alternativ eine direkt kompetitive Wirkung auf die NH_3 -Assimilation im Cytoplasma infizierter Zellen denkbar. Dafür spricht, dass bei selektiver Hemmung der wurzelspezifischen GS von *M. sativa* durch ein *Pseudomonas*-Toxin (und damit Änderung des Aminosäuremusters im Phloem) Nitrogenaseaktivität, Knöllchenzahl und -masse erhöht war, d.h. die Feedbackregulation beeinflusst wurde (Knight und Langston-Unkefer 1988). Auch eine direkte Aminosäurewirkung auf Bacteroide ist denkbar, da diese einen N-Sensor (FixLJ) besitzen, der an der Feedbackregulation beteiligt sein könnte (Bacanamwo und Harper 1997). In beiden Fällen müssten regulatorisch wirkende Aminosäuren in die infizierte Zelle, und im letzten Fall außerdem durch die PBM gelangen. Grundlage der Aufklärung dieser Vorgänge ist die Kenntnis der Transportprozesse im Knöllchen.

1.8 Ziele dieser Arbeit

Aus der vorhergehenden Schilderung der Knöllchenfunktion und deren Regulation wurde deutlich, dass Transportvorgänge für viele Prozesse unabdingbar sind. Prozesse des Kohlenstoff- und Stickstoffmetabolismus laufen in verschiedenen Gewebe- und Zelltypen ab (1.3), so dass ein Kurzstreckentransport von Metaboliten erforderlich ist (1.4). Für Import und Export müssen Metabolite zwischen Leitbündel und infizierter Zelle bewegt werden (1.5). Ferner ist noch unklar, auf welche Weise die turgorregulierte Gasdiffusionsbarriere in innerem Cortex (und Zentralgewebe?) funktioniert (1.6) und wo die Feedbackregulation durch rückverlagerte Aminosäuren ansetzt (1.7). Grundlage der Aufklärung dieser Prozesse ist ein Verständnis apoplastischer und symplastischer Transportvorgänge in den verschiedenen Geweben des Knöllchens. Struktur und Funktion von Transportwegen sind jedoch im indeterminierten Leguminosenknöllchen noch weitgehend ungeklärt.

Das Hauptziel dieser Arbeit bestand daher darin, durch Integration mehrerer histologischer und physiologischer Ansätze ein klareres Gesamtbild über mögliche Transportwege für Metabolite im indeterminierten Leguminosenknöllchen von *Vicia faba* L. zu gewinnen. Dazu musste zunächst ein adäquates System zur kontinuierlichen Kultur der Versuchspflanzen entwickelt werden (Kapitel 2). Mit diesen wurden folgende Komplexe bearbeitet:

1. Kapitel 3: *Wie sind die anatomischen Rahmenbedingungen des Metabolitentransports im Knöllchen?*

Der Knöllchencortex wurde hinsichtlich apoplastischer Barrieren licht- und elektronenmikroskopisch untersucht. Ferner wurde die symplastische Kontinuität zwischen Leitbündel und infizierter Zelle untersucht.

2. Kapitel 4: *Wie kann die Transportkompetenz verschiedener Zelltypen aus dem Zentralgewebe des Knöllchens untersucht werden?*

Es wurde eine Methode zur Isolation und Separation von Protoplasten aus dem Zentralgewebe des Knöllchens entwickelt. Die Protoplastenfractionen wurden anhand verschiedener Parameter charakterisiert.

3. Kapitel 5: *Sind nicht-infizierte und infizierte Zellen des Knöllchen-Zentralgewebes in der Lage, Zucker und Aminosäuren über die Plasmamembran zu transportieren?*

Die Fähigkeit des infizierten Gewebes zum apoplastischen Export von Aminosäuren wurde durch Inkubationsstudien ermittelt. Mit den in Kapitel 4 entwickelten Protoplastenfractionen wurden Transportstudien mit ^{14}C -markierten Metaboliten durchgeführt. Ferner wurde die Nettoabgabe von Protonen durch Zentralgewebe und Protoplasten untersucht.

Die Zusammenführung der Versuchsergebnisse erlaubte es, erste Schlussfolgerungen über symplastische und apoplastische Transportvorgänge im Knöllchen zu ziehen und auf deren Bedeutung für die Knöllchenfunktion zu schließen (Kapitel 6).

2 Bakterienkultivierung und Pflanzenanzuchten

2.1 *Rhizobium*-Kulturen

2.1.1 Chemikalien

Bezeichnung	Formel	Reinheit	Firma	No.
Bacto Agar			Difco	0140-01
Hefeextrakt			Difco	0127-17-9
D-Mannitol	$C_6H_{14}O_6$	puriss. p.a.	Fluka	63560
Natriumcarbonat	Na_2CO_3	p.a.	Merck	106392

Für Bakterienkulturen wurde entionisiertes Wasser verwendet.

2.1.2 Stammhaltung und Flüssigkulturen

Eine lyophilisierte Kultur von *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* Stamm 6044 (DSMZ, Braunschweig) wurde in Flüssigmedium lt. DSMZ (10 g L⁻¹ Mannitol, 1 g L⁻¹ Hefeextrakt, 200 mL L⁻¹ Bodenextrakt) resuspendiert, auf Schrägagarröhrchen (Flüssigmedium mit 15 g L⁻¹ Agar) ausgestrichen und 5 Tage bei 25°C inkubiert. Der dem Medium zugesetzte Bodenextrakt wurde durch Autoklavieren (1 h, 121°C) und anschließendes Abzentrifugieren einer Suspension von 80 g L⁻¹ Gartenboden und 0,2 g L⁻¹ Na₂CO₃ hergestellt. Er beschleunigte das Wachstum der Kulturen deutlich. Kühlschrankgelagerte Agarkulturen wurden halbjährlich subkultiviert. Zur Inokulation von Pflanzen wurde die Kultur eines Agarröhrchens in 100 mL Flüssigmedium überführt und 2 d bei 25°C und 120 min⁻¹ schüttelnd inkubiert.

2.2 Pflanzenanzuchten

2.2.1 Chemikalien

Bezeichnung	Formel	Reinheit	Firma	No.
Ammoniummolybdat	$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$	p.a.	RdH	31402
Ammoniumnitrat	NH_4NO_3	reinst	RdH	11217
Borsäure	H_3BO_3	p.a.	Merck	100165
Calciumchlorid	CaCl_2	reinst	RdH	12022
Calciumsulfat	CaSO_4	reinst	RdH	12056
Cobaltchlorid	CoCl_2	p.a.	Fluka	60820
Ethanol, vergällt	$\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$	95%	Schmidt	-
Ethylendiamintetraessigsre, Eisen(III)-Natriumsalz	$\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{FeN}_2\text{NaO}_8$	purum	Fluka	03650
Kaliumchlorid	KCl	reinst	RdH	12363
Kalium <i>d</i> hydrogenphosphat	KH_2PO_4	reinst	Merck	104871
<i>di</i> -Kaliumhydrogenphosphat	K_2HPO_4	reinst	Merck	105101
Kaliumhydroxid, Plätzchen	KOH	p.a.	Merck	105033
Kupfersulfat	CuSO_4	p.a.	Merck	102790
Magnesiumsulfat	MgSO_4	reinst	RdH	13142
Mangansulfat	MnSO_4	p.a.	Merck	105941
Natriumhypochlorid	NaOCl	pract.	Fluka	71696
Nickelsulfat	NiSO_4	p.a.	Merck	106727
Zinksulfat	ZnSO_4	p.a.	Merck	108883

Für sämtliche Pflanzenanzuchten wurde entionisiertes Wasser verwendet.

2.2.2 Anzucht von *Vicia faba* in Bodenkultur

Zur Gewinnung von N_2 -fixierenden Wurzelknöllchen wurden Pflanzen von *V. faba* L. cv. Troy zunächst in einem nährstoffarmen, hitzesterilisierten Unterboden (Herkunft Gießen-Kleinlinden) angezogen, dem eine Mischung aus Mikro- und Makronährstoffen ohne N zugesetzt war (Peiter et al. 2000). Die Samen wurden vor der Aussaat oberflächensterilisiert (30 sec in 70% Ethanol, 5 min in 5% NaOCl), um Kontamination mit undefinierten Rhizobienstämmen

zu vermindern (Hirsch 1996). Nach zwölfstündigem Vorquellen in 1 mM CaSO_4 wurden die Samen ausgesät und mit *Rhizobium*-Flüssigkultur (5 mL pro Same) inokuliert. Pro Gefäß (6 kg Boden) wurden fünf Pflanzen angezogen. Die Bodenfeuchte wurde täglich auf 60% der maximalen Wasserkapazität eingestellt. Die Pflanzen wuchsen in einer Klimakammer mit 16 h Tageslänge (Beleuchtung: Osram L 58 W/25 und Osram L 58 W/77, $220 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) und 22°C Tages- sowie 17°C Nachttemperatur. Zur Gewinnung von Knöllchen wurden die Wurzeln sieben bis acht Wochen alter Pflanzen mit Leitungswasser ausgewaschen.

Pflanzen aus Bodenkultur wurden nur für erste Protoplastenisolationen aus Knöllchen verwendet (4.2.2, 5.2.3). Diese Art der Pflanzenanzucht brachte einige entscheidende Nachteile mit sich: a. Das Auswaschen der Wurzeln war sehr aufwändig; b. Der Entwicklungszustand der Knöllchen konnte nicht verfolgt werden; c. Es konnten keine Einzelpflanzen zur Methodenentwicklung entnommen werden. Aus diesem Grund wurde ein Nährlösungssystem für N_2 -fixierende Ackerbohnen entwickelt.

2.2.3 Anzucht von *Vicia faba* in Nährlösungskultur

Oberflächensterilisierte und vorgequollene Samen (2.2.2) von *V. faba* cv. Troy wurden in aufrecht stehenden Filterpapierrollen mit einer Keimlösung (2 mM CaSO_4) befeuchtet und sieben Tage bei 25°C gekeimt. Pro Anzucht wurden 16 Keimlinge auf eine Wanne (50 L) mit belüfteter halbkonzentrierter Nährlösung (s.u.) mit 0,5 mM NH_4NO_3 überführt und zwei Tage darauf mit $0,1 \text{ mL L}^{-1}$ einer *Rhizobium*-Flüssigkultur (2.1.2) inokuliert. Am darauffolgenden Tag wurde die Nährlösung durch eine vollkonzentrierte, rhizobien- und NH_4NO_3 -freie Lösung ersetzt, die sich zusammensetzt aus (in μM) 2000 CaSO_4 , 1000 K_2SO_4 , 500 MgSO_4 , 200 KCl , 100 KH_2PO_4 , 100 K_2HPO_4 , 30 FeEDTA , 10 H_3BO_3 , 0,5

MnSO₄, 0,5 ZnSO₄, 0,5 CoCl₂, 0,2 CuSO₄, 0,05 (NH₄)₆Mo₇O₂₄, 0,01 NiSO₄. Die Nährlösung wurde täglich mit KOH auf pH 6,5 eingestellt und zweimal wöchentlich gewechselt. Ein Acetylenreduktionstest (Herdina und Silsbury 1990) belegte, dass die Nitrogenase-Aktivität in Nährlösung angezogener Pflanzen gleich hoch oder höher war, als diejenige von Pflanzen aus Bodenkultur.

Ein Hauptproblem der Nährlösungskultur stellte die starke pH-Absenkung durch die Nettoprotonenabgabe der Wurzeln N₂-fixierender Pflanzen dar (Mengel 1994). Insbesondere bei älteren Pflanzen konnte trotz regelmäßiger Titration eine Ansäuerung der Nährlösung bis auf Werte um pH 4,5 nicht verhindert werden. Aus diesem Grund wurde die weitere Nährlösungskultur in einer automatischen Titrationseinheit (Hydromobil, Bühler, Tübingen) durchgeführt (Abb. II.1 A). Diese fasste 400 L belüftete, umgewälzte Nährlösung, deren pH-Wert kontinuierlich mit KOH auf 6,0±0,2 eingestellt wurde. Da die Nährstoffkonzentrationen in der Nährlösung, mit Ausnahme von Phosphat, innerhalb drei Wochen nicht stark abnahmen, erfolgten Reinigung des Gerätes und Nährlösungswechsel in dreiwöchigem Abstand. Die Phosphatkonzentration wurde wöchentlich mit der Molybdat-Vanadat-Methode bestimmt (Gericke und Kurmies 1952) und mit KH₂PO₄ auf 200 μM eingestellt. Sie sank nie unter 50 μM.

Die inokulierten Pflanzen wurden zwei Wochen nach Aussaat in das Hydromobil überführt, in dem sich meist drei aufeinanderfolgende Anzuchten (je 16 Pflanzen) befanden. Da Pflanzenanzuchten in 14-tägigem Rhythmus stattfanden, standen während des gesamten Versuchszeitraums Pflanzen ähnlichen Alters zur Verfügung.

Die Pflanzen wuchsen zunächst in einer Klimakammer unter den in 2.2.2 beschriebenen Bedingungen. Ein Umzug des Institutes machte einen Wechsel der Klimakammer erforderlich. Für die in Kapiteln 3, 4.2.3-7 und 5.2.4-6

beschriebenen Versuche wurden die Pflanzen daher bei gleicher Temperatur und Tageslänge unter Na-Dampflampen (Philips SON-T AGRO 400, 500-900 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ in Pflanzenhöhe (70-30 cm Entfernung)) angezogen. Für sämtliche Versuche wurden Knöllchen von sieben bis acht Wochen alten Pflanzen verwendet (Abb. II.1 B, C).

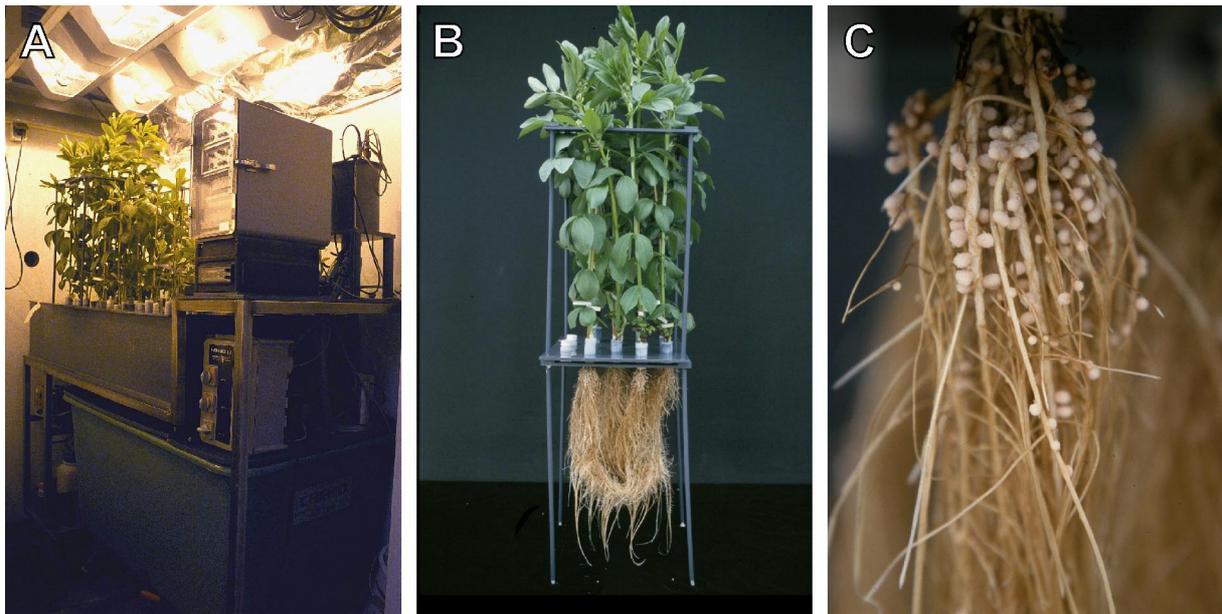


Abb. II.1: System zur kontinuierlichen Anzucht von *V. faba* in pH-kontrollierter Nährlösung. **A.** 400 L Nährlösung fassende pH-stat-Anlage. In dieser Anlage wurden meist drei Anzuchten mit je 16 Pflanzen parallel kultiviert. **B.** Die Pflanzen wurden mittels Szintillationsgefäßen und Schaumstoffschlauchstücken (Armaflex, Armstrong, Münster) in PVC-Deckeln befestigt. **C.** Wurzelsystem einer acht Wochen alten, effektiv nodulierten Pflanze.

2.2.4 Anzucht von *Glycine max* in Nährlösungskultur

Zur hydroponischen Anzucht nodulierter *G. max* (Sojabohne) wurden Samen von *G. max* cv. Jutro wie in 2.2.3 beschrieben in Filterpapierrollen vorgekeimt und in Nährlösung kultiviert. Die Keimlinge wurden mit einer Flüssigkultur (analog 2.1.2) von *Bradyrhizobium japonicum* Stamm 30131 (DSMZ,

Braunschweig) inokuliert ($0,1 \text{ mL L}^{-1}$). Da die N_2 -Fixierung bei *G. max* später einsetzte, enthielt die Nährlösung in den ersten drei Wochen $0,5 \text{ mM NH}_4\text{NO}_3$. Die weitere Kultur erfolgte zusammen mit *V. faba* in einer automatischen Titrationseinheit (Hydromobil, 2.2.3).

3 Anatomische Rahmenbedingungen des Metabolitentransports

3.1 Zielsetzung

Modifikationen der Zellwand mit Lignin und Suberin in Form von Casparystreifen und Suberinlamellen stellen Barrieren für Wasser, gelöste Stoffe und Gase dar (Peterson und Cholewa 1998). Im Knöllchen würden sich diese Barrieren auf Prozesse des Metabolitenimports und -exports (1.5), sowie auf die Gasdiffusion (1.6) auswirken. Voruntersuchungen an Freihandschnitten von *V. faba*-Knöllchen zeigten zwei Schichten mit solchen Zellwandmodifikationen (Abd-Alla et al. 2000): Eine *Knöllchenendodermis* befand sich zwischen innerem und äußerem Cortex und umgab zylindrisch das Knöllcheninnere. Eine *vasculäre Endodermis* umschloss die im inneren Cortex gelegenen Leitbündel. Die Entwicklung, Ultrastruktur und Zusammensetzung dieser Barrieren kann Aufschluss über deren Funktion geben. Diese Schichten wurden daher mit verschiedenen Methoden licht-, fluoreszenz- und elektronenmikroskopisch untersucht. Ergänzt wurden diese Beobachtungen durch eine chemische Analyse der Zellwandzusammensetzung (Hartmann et al. 2002).

Symplastisch können Metabolite durch Plasmodesmen von Zelle zu Zelle gelangen. Zur Beurteilung der Möglichkeit dieses Transportwegs im Leguminosenknöllchen wurden Plasmodesmendichten zwischen verschiedenen Zelltypen elektronenmikroskopisch ermittelt (Abd-Alla et al. 2000).

Gesamtziel dieses Teils der Arbeit war die Beurteilung der anatomischen Rahmenbedingungen des Metabolitentransports im Knöllchen.

3.2 Material und Methoden

3.2.1 Chemikalien

Bezeichnung	Formel	Reinheit	Firma	No.
Aceton	C_3H_6O	p.a.	Merck	100014
Agarose, low melting point			Sigma	A9414
Berberinhemisulfat	$C_{20}H_{18}NO_4 \cdot \frac{1}{2} SO_4$	>95%	Sigma	B3412
Bleicitrat		f. EM	Plano	R1210
Eisen(III)chlorid	$FeCl_3$	p.a.	RdH	31232
Ethanol 99,8%	C_2H_6O	p.a.	Merck	100983
Fat Red 7B (Sudan Red 7B)	$C_{24}H_{21}N_5$	~95%	Sigma	F1000
Fluorol Yellow 088	$C_{22}H_{16}O$		Sigma	F5520
Formaldehydlösung 37%	CH_2O	p.a.	Merck	104003
Gefriermedium			Microm	358100
Glycerin	$C_3H_8O_3$	f. Fl.-Mik.	Merck	104095
Glutaraldehyd		f. EM	Plano	R1020
Kaliumchlorid	KCl	puriss. p.a.	Fluka	60130
Natriumchlorid	NaCl	puriss. p.a.	Fluka	71379
<i>di</i> -Natriumhydrogenphosphat	Na_2HPO_4	p.a.	Merck	106579
Osmiumtetroxyd	OsO_4	f. EM	Plano	R1023
Polyethylenglykol 400			Sigma	P3265
1,2-Propylenoxid	C_3H_6O	f. EM	Merck	112492
D-(+)-Saccharose	$C_{12}H_{22}O_{11}$	>99%	Fluka	84100
SPURR Harz-Kit		f. EM	Plano	R1032
Sudan III	$C_{22}H_{16}N_4O$	~ 95%	Sigma	S4131
Toluidinblau O	$C_{15}H_{16}ClN_3S$		Merck	115930
Uranylacetat		f. EM	Plano	R1260A
Water Blue (Anilin Blue)	$C_{37}H_{27}N_3Na_2O_9S_3$		Fluka	95290

Für alle Lösungen, Puffer, Medien etc. wurde hochaufgereinigtes (Milli-Q, Millipore, Eschborn) entionisiertes Wasser verwendet.

3.2.2 Cryomikrotomie

Frisch abgetrennte Knöllchen wurden längs halbiert, in einer phosphatgepufferten Salzlösung (PBS; 10 mM PO_4^{3-} ; pH 7,4) mit Formaldehyd (37 mg g⁻¹)

24 h lang fixiert und danach mit einer Saccharoselösung (300 g L⁻¹) vakuumfiltriert. Die Knöllchenhälften wurden in längs aufgeschnittenen, mit Gefriermedium gefüllten Beem-Kapseln (Plano, Wetzlar) vertikal ausgerichtet und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Nach Entfernen der Kapsel wurde der gefrorene Mediumblock mit Gefriermedium auf einen Probenteller geklebt, der daraufhin auf -50°C gekühlt wurde. Serielle Querschnitte von 14-16 µm Dicke wurden mit einem Gefriermikrotom (Cryostat H 500 OM, Microm, Walldorf) bei -30°C angefertigt, mit Hilfe eines Zahnstochers auf Chromalaun-Gelatine-beschichtete Glas-Objektträger aufgebracht und sofort mit 50 %igem Glycerin oder einer Färbelösung (siehe 3.2.3) bedeckt.

3.2.3 Licht- und Fluoreszenzmikroskopie

Apoplastische Modifikationen wurden histologisch anhand von Freihand- und Cryoschnitten untersucht. Zum Nachweis von Suberindepositionen wurden Schnitte nach der Methode von Brundrett et al. (1991) mit den lipophilen Farbstoffen Sudan Red 7B oder Fluorol Yellow 088 angefärbt. Casparystreifen wurden mit Berberinhemisulfat und Anilinblau sichtbar gemacht (Brundrett et al. 1988). Sundangefärbte Schnitte wurden im Hellfeld betrachtet; mit Fluorol Yellow oder Berberin und Anilinblau gefärbte Schnitte wurden fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Verwendet wurde dazu ein mit einer digitalen Videokamera ausgestattetes Olympus AX 70 Mikroskop (Olympus, Hamburg) mit Anregungsfilter (330 - 385 nm), dichromatischem Spiegel (400 nm) und Sperrfilter (420 nm), sowie ein Zeiss Axioplan Mikroskop (Zeiss, Oberkochen) mit Anregungsfilter (365 nm), dichromatischem Spiegel (395 nm) und Sperrfilter (420 nm), an das eine Digitalkamera (Axiocam, Zeiss) angeschlossen war.

3.2.4 Transmissionselektronenmikroskopie

Die Probenvorbereitung zur Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) erfolgte wie bei Abd-Alla et al. (2000) beschrieben. Knöllchen wurden halbiert, in Glutaraldehyd (20 g L^{-1}) fixiert, in OsO_4 nachfixiert, langsam in einer aufsteigenden Acetonreihe entwässert und mit Spurrchem Harz infiltriert (Spurr 1969). Nach der Polymerisation wurden mit einem Ultramikrotom (Ultratome II, LKB, Stockholm, Schweden) Ultradünnschnitte (60-90 nm) angefertigt und auf beschichtete Kupfernetze aufgebracht. Die Schnitte wurden mit Uranylacetat und Bleicitrat kontrastiert (Reynolds 1963) und mit einem Philips EM 300 Elektronenmikroskop (Philips, Amsterdam, Niederlande) betrachtet.

Die Bestimmung der Plasmodesmenhäufigkeiten wurde von M.H. Abd-Alla (Assiut University, Ägypten) und H.-W. Koyro (Institut für Pflanzenökologie, JLU Gießen) durchgeführt und erfolgte wie bei Abd-Alla et al. (2000) beschrieben.

3.3 Ergebnisse

Zur Aufklärung der Entwicklung apoplastischer Barrieren im Knöllchencortex wurde eine Cryosektionsmethode entwickelt (3.2.2), mit der transversale Schnittserien angefertigt werden konnten. In allen Querschnitten, die infiziertes Zentralgewebe enthielten, färbten die Wände der Knöllchenendodermis positiv mit Fluorol Yellow 088 (Abb. III.1 C). Dies ist ein Hinweis auf die Anwesenheit lipophiler Substanzen (Suberin) in dieser Schicht. Im Gegensatz dazu zeigte die Leitbündelendodermis nur in älteren Abschnitten eine Fluorol Yellow-Färbung (Abb. III.1 D). Damit folgten beide Gewebetypen

unterschiedlichen Entwicklungssequenzen, deren Abfolge im folgenden näher erläutert und mit der Entwicklung der Wurzelendodermis von *V. faba* verglichen wird.

3.3.1 Entwicklung apoplastischer Barrieren der Wurzel

Transversale Cryoschnitte verschiedener Entwicklungsstadien der Wurzel von *V. faba* wurden fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Fluorol Yellow 088-induzierte Fluoreszenz von Aliphaten trat in Epidermis- und Endodermiswänden auf. In der Endodermis jüngerer Wurzelabschnitte (10 cm vom Apex) war ein Casparystreifen klar erkennbar (Abb. III.1 A), während ältere Wurzelteile dort zusätzlich eine vollständige Suberinlamelle aufwiesen, die autofluoreszierte (Abb. III.1 B) und mit Fluorol Yellow 088 anfärbbar war (nicht gezeigt). Die Wurzelendodermis von *V. faba* durchlief damit eine typische Entwicklungssequenz (Schreiber et al. 1999) von Stadium I (Casparystreifen; Abb. III.1 A) zu Stadium II (zusätzlich Suberinlamellen; Abb. III.1 B), was frühere Arbeiten bestätigt (z.B. Weerdenburg und Peterson 1984, Enstone und Peterson 1992a).

3.3.2 Entwicklung der vasculären Endodermis des Knöllchens

Doppelfärbung mit Berberin und Anilinblau visualisierte die Entwicklung des Casparystreifens der vasculären Endodermis (Abb. III.1 E-H). Dieser bildete sich unmittelbar hinter dem Knöllchenmeristem (Abb. III.1 E). Seine Fluoreszenzintensität stieg mit zunehmendem Alter (Abb. III.1 F). In basalen Knöllchenteilen zeigten Wände der vasculären Endodermis zusätzlich Autofluoreszenz durch Deposition aromatischer Substanzen (Abb. III.1 G).

Diese trat zunächst ausschließlich um Zellen auf, die an die Knöllchenendodermis angrenzten. Diese asymmetrische Lamellenbildung war auch sichtbar in Längsschnitten durch Berberin-Anilinblau-gefärbte Leitbündel, wo autofluoreszierende Lamellen nur um dorsale Zellen der vasculären Endodermis vorhanden waren (Abb. III.1 M). In der Knöllchenbasis dehnte sich die Autofluoreszenz auf fast alle Zellen der vasculären Endodermis aus (Abb. III.1 H). Die Entwicklung der Ablagerung lipophiler Materialien wurde durch Sudan Red 7B-Färbungen nachgewiesen (Abb. III.1 I-L) und war identisch mit der Entwicklung autofluoreszierender Schichten. Dementsprechend begann die Bildung von Suberinlamellen zuerst bei dorsalen Zellen der vasculären Endodermis (Abb. III.1 K) und breitete sich mit zunehmendem Alter auf andere Endodermiszellen aus (Abb. III.1 L).

Obwohl die beschriebene Entwicklungssequenz der vasculären Endodermis in fast allen Fällen zutraf, konnte die Entwicklung von Suberinlamellen zwischen Leitbündelsträngen gleichen Alters variieren (Abb. III.1 N). In älteren Knöllchenteilen blieben einige wenige Stränge fast unsuberinisiert, während die meisten mehr oder weniger vollständige Lamellen ausbildeten (wie in Abb. III.1 L). An der Knöllchenbasis fusionierten vasculäre und Knöllchenendodermis mit der Wurzelendodermis (Abb. III.1 O). In diesem Punkt befanden sich alle drei Schichten im gleichen Stadium (voll entwickelte Suberinlamellen).

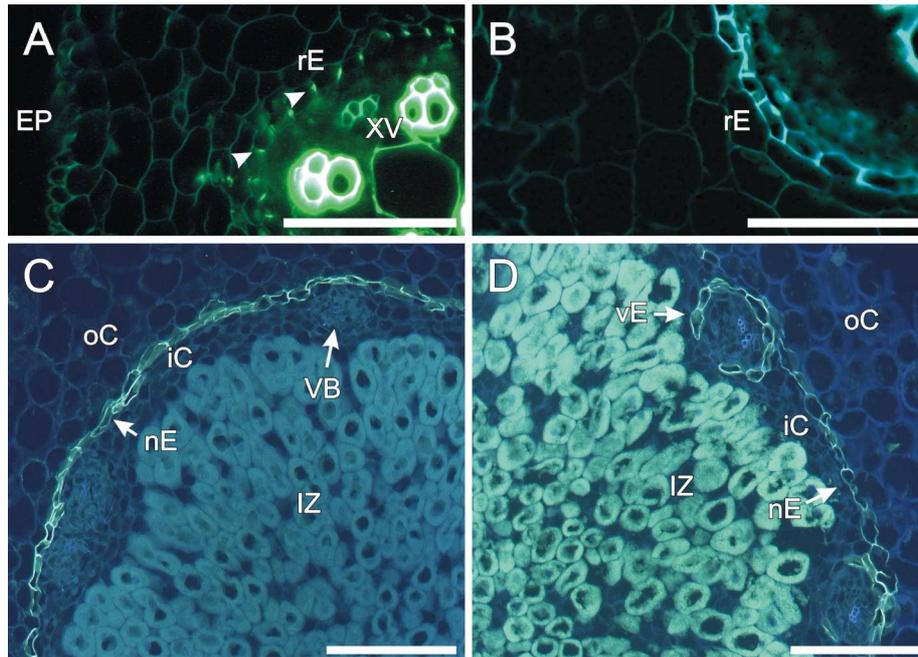


Abb. III.1. A, B. Querschnitte durch Seitenwurzeln von *V. faba*. Balken: 200 μm . **A.** Fluorol Yellow 088-Färbung. Xylemgefäße (XV) und Casparystreifen (Pfeilspitzen) der Wurzelendodermis (rE) fluoreszieren stark, die Epidermis (EP) nur schwach. **B.** Autofluoreszenzaufnahme eines älteren Wurzelabschnittes. Zellen der Wurzelendodermis im Stadium II sind von Suberinlamellen umgeben. **C, D.** Querschnitte durch ein sechs Wochen altes *V. faba*-Knöllchen, gefärbt mit Fluorol yellow 088. Balken: 200 μm . **C.** Ca. 1 mm hinter Apex. Die infizierte Zone (IZ) im Innern des Knöllchens ist umgeben von einem inneren Cortex (iC), gefolgt von Knöllchenendodermis (nE) und äußerem Cortex (oC). Leitbündel (VB) liegen im inneren Cortex. **D.** Ca. 4 mm hinter Apex. Einige Zellen der vasculären Endodermis (vE) besitzen Suberinlamellen. Infizierte Zellen zeigen Fluoreszenz aufgrund von Bacteroid- und Peribacteroidmembranen, die den lipophilen Farbstoff binden. Abbildung aus Hartmann et al. (2002).

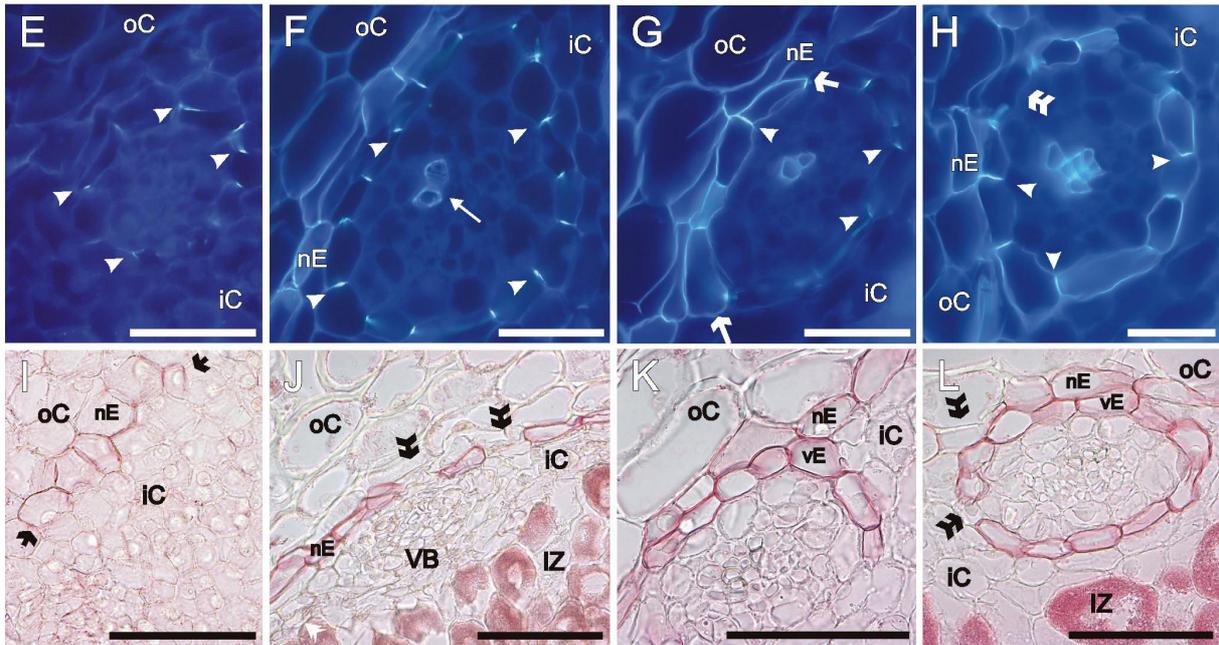


Abb. III.1 (Fortsetzung). E-H. Querschnitte durch ein sechs Wochen altes *V. faba* Knöllchen, gefärbt mit Berberin und Anilinblau. Balken: 50 μm . **E.** Ca. 0,5 mm hinter Apex. Casparystreifen (Pfeilspitzen) umschließen die zukünftigen Leitbündel, die noch keine lignifizierte Xylemelemente enthalten. **F.** In fortgeschrittenem Entwicklungsstadium zeigen die Casparystreifen stärkere Fluoreszenz und die Leitbündel besitzen lignifizierte Xylemelemente. **G.** Ca. 2 mm hinter Apex. Neben Casparystreifen (Pfeilspitzen) hat die vasculäre Endodermis autofluoreszierende Suberinlamellen um Zellen entwickelt, die sich nahe der Knöllchenendodermis befinden (Pfeile). **H.** Ca. 4 mm hinter Apex. Weitere Zellen der vasculären Endodermis haben autofluoreszierende Lamellen entwickelt. Einige Zellen von vasculärer und Knöllchenendodermis verbleiben ohne Lamelle (Doppelspitze). I-L. Querschnitte durch ein sechs Wochen altes *V. faba* Knöllchen, gefärbt mit Sudan Red 7B. Balken: 100 μm . **I.** Ca. 0,5 mm hinter Apex. Die Knöllchenendodermis (Pfeile), gekennzeichnet durch schwache Rotfärbung der Suberinlamellen, erscheint, bevor Leitbündel und infizierte Zellen erkennbar sind. **J.** Ca. 1 mm hinter Apex. Die Färbung der Knöllchenendodermis wird intensiver. Einige Zellen verbleiben ohne Lamelle (doppelte Pfeilspitze). Diese Durchlasszellen befinden sich immer nahe Leitbündeln. Infizierte Zellen färben rot aufgrund von Bacteroid- und Peribacteroidmembranen. **K.** Ca. 2 mm hinter Apex. Einige Zellen der vasculären Endodermis haben rotfärbende Suberinlamellen entwickelt. **L.** Ca. 4 mm hinter Apex. Nahe der Knöllchenbasis hat die vasculäre Endodermis Stadium II beinahe erreicht. Abbildung aus Hartmann et al. (2002).

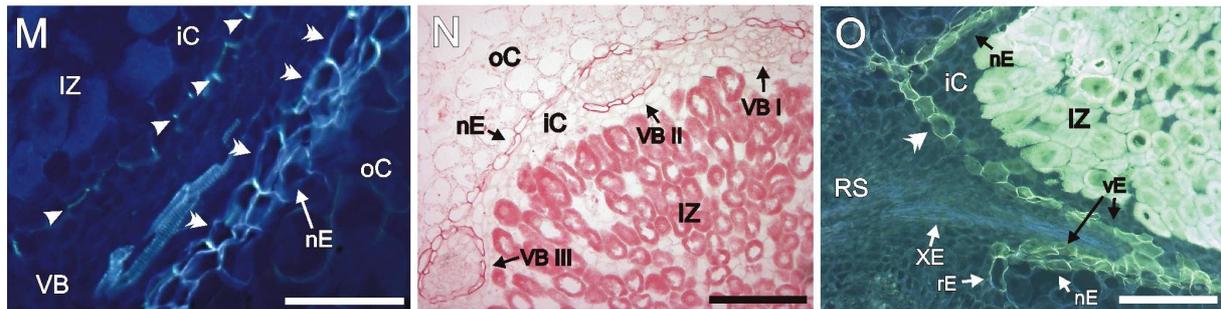


Abb. III.1 (Fortsetzung). M. Längsschnitt durch ein Leitbündel eines Knöllchens, gefärbt mit Berberin und Anilinblau, ca. 2 mm hinter Apex. Die Entwicklung der vasculären Endodermis ist asymmetrisch. Proximal (zur infizierten Zone) liegt ein Casparystreifen vor (Pfeilspitzen), während sich distal (zur Knöllchenendodermis) zusätzlich Suberinlamellen entwickelten (Doppelspitzen). Balken: 200 μm . N. Querschnitt durch ein Knöllchen, gefärbt mit Sudan Rot 7B, ca. 4 mm hinter Apex. An der Basis des Knöllchens liegen wenige Leitbündel in fast lamellenfreiem Zustand vor (VB I), während die meisten vasculären Endodermen teilweise oder fast vollständig von Lamellen umgeben sind (VB II, III). Balken: 200 μm . O. Längsschnitt durch ein Knöllchen mit angrenzender Wurzel, gefärbt mit Fluorol Yellow 088. Knöllcheninneres (IZ, iC) und Wurzelzentralzylinder (RS) werden durch die Knöllchen-Vasculärendodermis getrennt, die vollständig Stadium II erreicht hat (Doppelspitze). Die Endodermen von Knöllchen (nE), Knöllchenleitbündel (vE) und Wurzel (rE) fusionieren an der Knöllchenbasis. Wurzelzentralzylinder und vasculäres System des Knöllchens bilden ein apoplastisches Kontinuum. Balken: 200 μm . Abbildung aus Hartmann et al. (2002).

Anhand von Querschnitten war ersichtlich, dass ein einzelnes Leitbündel das vasculäre System des Knöllchens mit dem Zentralzylinder der Wurzel verbindet (Abb. III.2).

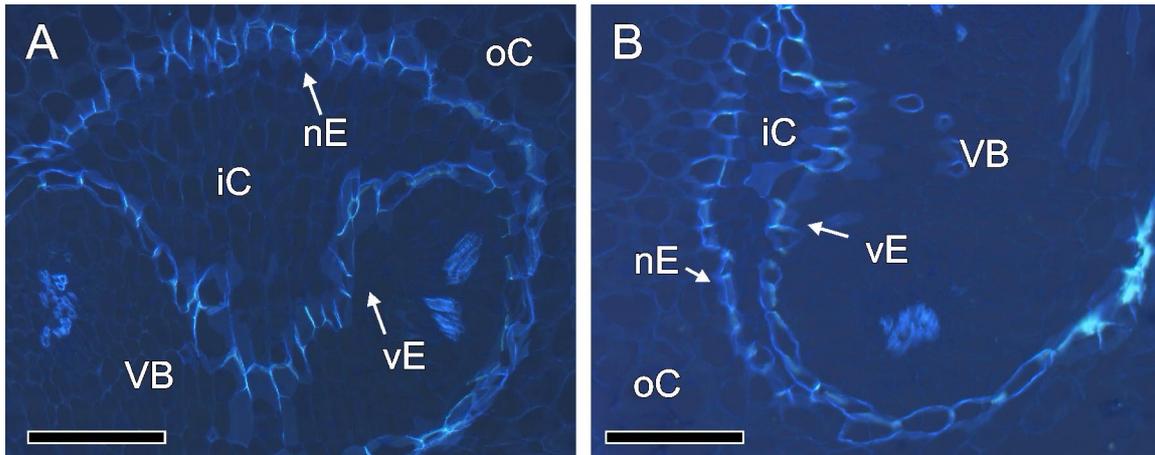


Abb. III.2. A. Querschnitt durch die Basis eines *V. faba*-Knöllchen nahe der Wurzel, Autofluorezenzaufnahme. Der Leitbündelstrang (VB) teilt sich dichotom. Zwischen Knöllchenendodermis (nE) und Leitbündelendodermis (vE) befindet sich innerer Cortex (iC). Balken: 200 μm . B. Gleiches Knöllchen wie A, unmittelbar vor Wurzel-Zentralzylinder. Das Leitbündel füllt fast den gesamten von der Knöllchenendodermis ausgefüllten Innenraum aus. Balken: 200 μm .

3.3.3 Entwicklung der Knöllchenendodermis

Die Entwicklung der Knöllchenendodermis unterschied sich deutlich von der der vasculären Endodermis. Unmittelbar hinter dem meristematischen Apex deutete eine schwache Sudanfärbung auf die Anwesenheit von Suberinlamellen um Zellen der Knöllchenendodermis, aber nicht der vasculären Endodermis (Abb. III.1 I). Ein Casparystreifen konnte in diesem frühen Stadium jedoch nicht nachgewiesen werden (Abb. III.1 E). Damit folgt die Knöllchenendodermis nicht der für Endodermen gewöhnlichen Entwicklungssequenz von Stadium I (Casparystreifen) zu Stadium II (zusätzlich Lamellen). Mit zunehmendem Alter stieg die Intensität der Sudan-Anfärbung (Abb. III.1 J), d.h. es wurde weiterhin Suberin abgelagert. Einige Zellen der Knöllchenendodermis, die sich immer nahe den Leitbündeln befanden, besaßen keine Suberinlamelle. Diese Durchlasszellen (Peterson und Enstone 1996) blieben auch an der Knöllchenbasis unsuberinisiert (Abb. III.1 L).

3.3.4 Ultrastruktur von Zellwänden im Cortex des Knöllchens

Zellwände des äußeren Cortex waren nicht von homogener Stärke, sondern charakterisiert durch distinkte Verstärkungen um Interzellularen (Abb. III.3 A), typisch für ein lacunares Collenchym. Zwischen Nachbarzellen wiesen kontrahierte Wandregionen auf primäre Tüpfelfelder hin (Abb. III.3 B). Wände des äußeren Cortex waren wesentlich dicker als solche der angrenzenden Knöllchenendodermis (Abb. III.3 C), die inneren und äußeren Cortex trennt (Abb. III.3 D). Wände der Knöllchenendodermis waren nicht dicker als solche des inneren Cortex, wiesen aber eine Lamelle auf, die einzelne Zellen ganz umschloss (Abb. III.3 E). In den untersuchten Schnitten besaß die vasculäre Endodermis keine solche Lamelle, sondern immer Casparystreifen-typisch modifizierte Radialwände (Abb. III.3 F). Die vasculäre Endodermis bedeckte ein Pericycl, dessen Zellen für Transferzellen typische Zellwandinvaginationen besaßen (Abb. III.3 G). Bei stärkerer Vergrößerung war erkennbar, dass die Plasmamembran der vasculären Endodermis eng am Casparystreifen anlag (Abb. III.3 H), während sie mit anderen Teilen der Zellwand nur lose assoziiert war.

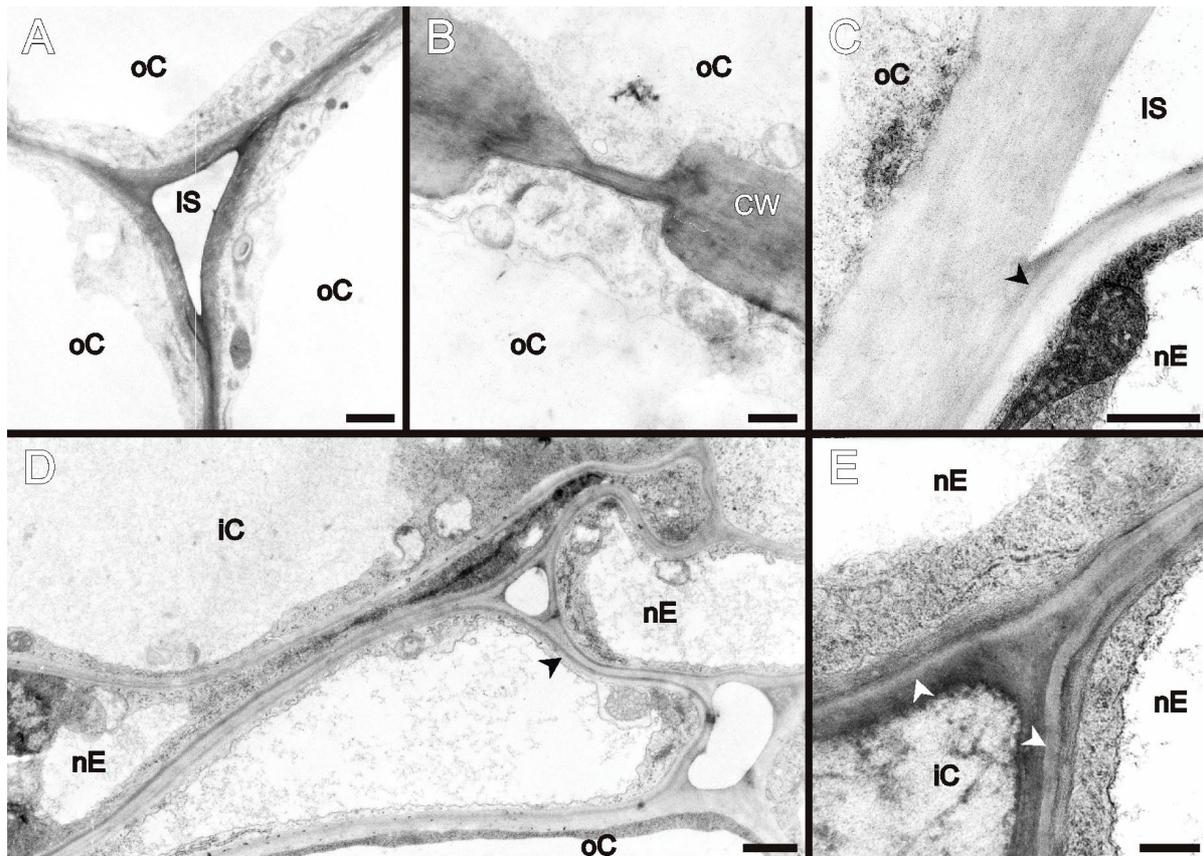


Abb. III.3. TEM-Aufnahmen eines fünf Wochen alten Knöllchens, kontrastiert mit Uranylacetat und Bleicitrat. **A.** Im äußeren Cortex (oC) des Knöllchens sind die Zellen locker angeordnet. Große Interzellularen (IS) sind von verdickten Zellwänden umgeben. Balken: 2 μm . **B.** Zellwandbereiche (CW) von benachbarten äußeren Cortexzellen besitzen viele primäre Tüpfelfelder. In diesen Regionen treten lamellare Strukturen auf. Balken: 0,5 μm . **C.** Die Zellwände von äußerem Cortex und Knöllchenendodermis (nE) mit Suberinlamelle (Pfeilspitze) unterscheiden sich deutlich in ihrer Dicke. Balken: 0,5 μm . **D.** Die Knöllchenendodermis liegt zwischen innerem (iC) und äußerem Cortex. Ihre Zellen sind von Suberinlamellen umgeben (Pfeilspitze), enthalten jedoch keinen Casparystreifen. Balken: 1,0 μm . Abbildung aus Hartmann et al. (2002).

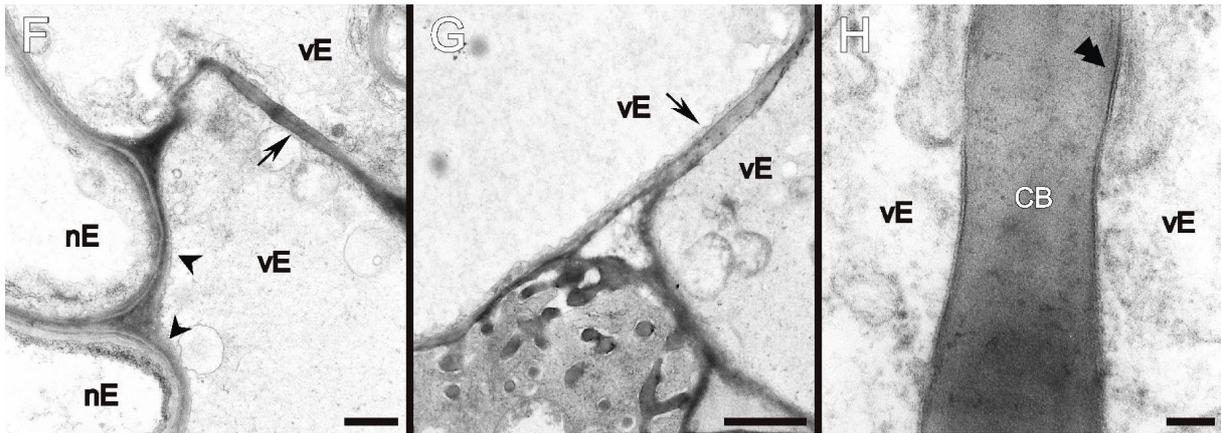


Abb. III.3 (Fortsetzung). TEM-Aufnahmen eines fünf Wochen alten Knöllchens, kontrastiert mit Uranylacetat und Bleicitrat. **F.** Knöllchenendodermis (nE; mit Suberinlamelle, Pfeilspitzen) und vasculäre Endodermis (vE; mit Casparystreifen, Pfeil) liegen nebeneinander. Balken: 1,0 μm . **G.** Innerhalb des Leitbündels befinden sich Transferzellen (TC) mit eingestülpten Zellwänden unmittelbar unter der vasculären Endodermis, erkennbar durch den Casparystreifen (Pfeil). Balken: 5,0 μm . **H.** Im Casparystreifen (CB) der vasculären Endodermis ist die Plasmamembran (Doppelpfeil) eng mit der Zellwand verbunden. Balken: 0,1 μm . Abbildung aus Hartmann et al. (2002).

3.3.5 Symplastische Kontinuitäten im Knöllchen

Anhand transmissionselektronenmikroskopischer Aufnahmen wurde die Anzahl plasmodesmaler Verbindungen für alle Grenzflächen zwischen vasculärer Endodermis und infizierter Zelle bestimmt (Abb. III.4). Eine hohe Konnektivität lag vor zwischen Zellen der vasculären Endodermis, des inneren Cortex und nicht-infizierten Zellen des Zentralgewebes. Infizierte Zellen waren an nicht-infizierte und innere Cortexzellen angebunden. Zwischen infizierten Zellen gab es jedoch fast keine Verbindungen.

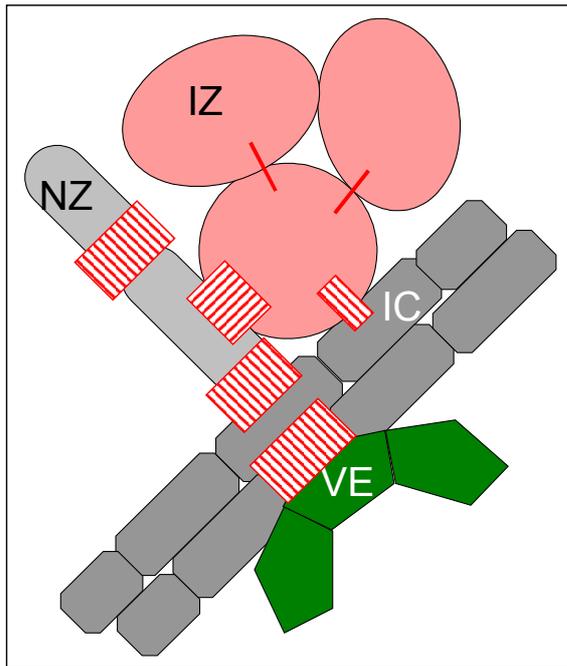


Abb. III.4. Diagramm der relativen Plasmodesmenhäufigkeiten zwischen vasculärer Endodermis (vE), innerem Cortex (iC), sowie nicht-infizierten (NZ) und infizierten (IZ) Zellen des Zentralgewebes fünf Wochen alter *V. faba*-Knöllchen. Die Breite der roten Balken zeigt die relative Häufigkeit von Plasmodesmen. Daten aus Abd-Alla et al. (2000).

3.4 Diskussion

In Übereinstimmung mit früheren Arbeiten an *V. faba*-Knöllchen (Frazer 1942, Pate et al. 1969, Abd-Alla et al. 2000) zeigten auch die vorliegenden licht- und fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen die Präsenz zweier endoderma-ler Schichten im Cortex des Knöllchens (Abb. III.1). Ziel dieser Arbeit war eine eingehendere Untersuchung von Entwicklung und Ultrastruktur dieser Schichten, die Hinweise auf deren Funktionen geben können.

3.4.1 Die vasculäre Endodermis des Knöllchens

3.4.1.1 Entwicklung und Morphologie der vasculären Endodermis

Brown und Walsh (1996) führten eine anatomische Studie mit 42 Legumino- senarten durch und fanden in allen untersuchten Knöllchen eine vasculäre Endodermis. Diese ist daher wahrscheinlich essentiell für die Knöllchenfunktio-

on. In der vorliegenden Arbeit zeigten transversale Schnittserien vom Apex zur Basis des Knöllchens, dass sich die vasculäre Endodermis des *V. faba*-Knöllchens ähnlich entwickelt wie die der Wurzel (vergleiche A, B in Abb. III.1 mit E-H und I-L). Eine Endodermis im Stadium I (charakterisiert durch Casparystreifen, Schreiber et al. 1999) ist vorhanden, bevor lignifizierte Xylemelemente erscheinen (Abb. III.1 E), wie es auch bei Seitenwurzeln der Fall ist (Peterson und Lefcourt 1990). Wie zuvor bei Maiswurzeln beobachtet (Zeier et al. 1999a), liegt die Plasmamembran im Casparystreifen eng an der Zellwand an (Abb. III.3 H). Mit fortschreitender Entwicklung umgibt eine Suberinlamelle einzelne Zellen der vasculären Endodermis, die damit zum Stadium II (Schreiber et al. 1999) übergeht (Abb. III.1 K). Wie in Wurzeln (Peterson und Cholewa 1998) bilden nicht alle Endodermiszellen gleichzeitig Suberinlamellen, so dass eine vollständige Stadium II-Endodermis erst an der Basis des Knöllchens vorliegt (Abb. III.1 L). Im Unterschied zur Wurzelendodermis läuft jedoch die Entwicklung der vasculären Endodermis räumlich stark „komprimiert“ ab. Dies ist wahrscheinlich durch die, im Vergleich zu Wurzeln, sehr langsame Elongation des Knöllchens verursacht. Für Wurzeln wurde gezeigt, dass der endodermale Casparistreifen bei langsamer Wachstumsrate näher an der Wurzelspitze auftritt (Peterson und Lefcourt 1990). In indeterminierten Knöllchen fehlt der Casparystreifen daher nur an der meristematischen Spitze. In meristematischen Geweben sind apoplastische Stoffbewegungen durch die extrem geringe Porengröße der jungen Zellwände unterbunden (Enstone und Peterson 1992b). Determinierte Knöllchen mit nur transients meristematischer Aktivität (1.2) besitzen Leitbündel, die entweder Anastomosen bilden, oder in Endodermistaschen enden (Walsh et al. 1989b, Walsh et al. 1992). In beiden Knöllchentypen, determinierten und indeterminierten, wird das vasculäre System daher durch Casparystreifen apoplastisch vom Zentralgewebe getrennt. Aus diesem Grund können gelöste Stoffe ausschließlich symplastisch, d.h. durch Endodermiszellen, zwischen

Zentralgewebe und Fernleitsystem verkehren und müssen zur Xylembeladung in den Leitbündelapoplasten entlassen werden. Transferzellen, die unmittelbar an die vasculäre Endodermis angrenzen (Abb. III.3 G), dienen wahrscheinlich der Beschleunigung dieses Prozesses durch Erhöhung der Plasmamembranoberfläche (Pate et al. 1969, Gunning et al. 1974).

3.4.1.2 Barrierefunktionen der vasculären Endodermis

Für Wurzeln wurde gezeigt, dass die Endodermis im Stadium I (Casparystreifen) für Wassermoleküle durchlässig ist, da deren Verletzung in nur minimal erhöhter lateraler hydraulischer Leitfähigkeit resultiert (Peterson und Steudle 1993). Da die Wurzelendodermis für gelöste Stoffe aber eine Barriere darstellt (Steudle und Peterson 1998), funktioniert sie wie eine semipermeable Osmometermembran. Eine Akkumulation osmotisch wirksamer Stoffe im Leitbündel führt durch diese Eigenschaft zum Wurzeldruck, der bei Verletzung der Endodermis zusammenbricht (Streeter und Salminen 1992). Auch im Knöllchen könnte im Falle (sekundär) aktiver Xylembeladung ein hydrostatischer Druck (analog dem Wurzeldruck) im vasculären System generiert werden, der gelöste Stoffe aus dem Knöllchen treiben würde. Diese drüsenähnliche Funktion des Knöllchens wird unterstützt durch den hohen Leitungswiderstand der Xylemgefäße des Knöllchens (Walsh 1995).

Nicht von Suberinlamellen umgebene vasculäre Endodermiszellen (Abb. III.1) des Knöllchens können mit dem sie umgebenden Apoplasten gelöste Stoffe austauschen. Die Relevanz dieses Schrittes ist noch unbekannt. Sollte er von Bedeutung sein, so wären plasmamembranquerende Stoffflüsse am intensivsten bei ventralen, zum N₂-fixierenden infizierten Zentralgewebe gerichteten Endodermiszellen. Dies könnte ein Grund dafür sein, dass Suberinlamellen, die Endodermiszellen apoplastisch isolieren, zunächst um

dorsale, dem Knöllchenäußeren zugewandte Endodermiszellen gebildet werden (Abb. III.1 G, K). Eine mehr oder weniger vollständige Stadium II-Endodermis wurde nur in seneszenten basalen Teilen des Knöllchens gefunden, und könnte dort den Verlust von Wasser und gelösten Stoffen aus dem Leitbündel verhindern. Eine in dieser Hinsicht ähnliche „Pipeline-Funktion“ wurde auch endodermisartigen suberinisierten Scheiden in Sprossen einer Wasserpflanze zugeschrieben, die dort ein Lecken von Substanzen aus dem Zentralzylinder verhindern (Dalla Vecchia et al. 2000).

3.4.2 Die Knöllchenendodermis

3.4.2.1 Entwicklung und Morphologie der Knöllchenendodermis

Die Knöllchenendodermis unterschied sich deutlich in Ultrastruktur und Entwicklung von der vasculären Endodermis. In TEM-Aufnahmen lag die vasculäre Endodermis im Stadium I (Casparystreifen) neben einer Knöllchenendodermis, deren Zellen von Suberinlamellen umgeben waren (Abb. III.3 D-G). Diese Beobachtung wird untermauert durch histologische Befunde: Zellen der Knöllchenendodermis färbten schon in Apikalregionen positiv für Lamellen (Abb. III.1 I), aber nicht für Casparystreifen (Abb. III.1 E), d.h. eine Modifikation von Primärwänden war histologisch nicht nachweisbar. Nach enzymatischem Verdau unmodifizierter Wände zerfällt diese Schicht jedoch nicht in Einzelzellen, sondern bleibt rasterelektronenmikroskopisch als geschlossene Decke erkennbar (Hartmann et al. 2002). Dies deutet darauf hin, dass auch die Primärwände der Knöllchenendodermis modifiziert sind.

3.4.2.2 Barrierefunktionen der Knöllchenendodermis

Die dichte Anordnung lamellenumhüllter Zellen in der Knöllchenendodermis deutet auf eine Funktion dieser Schicht als Barriere für Wasser, gelöste Stoffe und Gase. Die Barrierefunktion wird unterstützt durch einen, im Vergleich zur Wurzelendodermis, sehr hohen Gehalt an Lignin- und Suberinmonomeren (Hartmann et al. 2002).

Barriere für Wasser. Die Fähigkeit von Leguminosenknöllchen, Wasser aus dem umgebenden Medium aufzunehmen, wurde in der Vergangenheit kontrovers diskutiert (Walsh 1990, Streeter und Salminen 1992). Die Beantwortung dieser Frage wird erschwert durch die Diversität der Cortexarchitekturen verschiedener Knöllchentypen (Brown und Walsh 1994, Brown und Walsh 1996). Da sich Knöllchen jedoch meist an basalen Wurzelteilen, d.h. in oberen und oft trockenen Bodenschichten, befinden, ist die Vermeidung von Wasserverlusten sicherlich bedeutsamer als die Fähigkeit zur Wasseraufnahme. In dieser Hinsicht könnte der Knöllchenendodermis eine zentrale Bedeutung zukommen, da Suberinlamellen, im Gegensatz zu Casparystreifen, eine starke Barriere des Wassertransports darstellen, indem sie den transzellulären Weg blockieren (Steudle und Peterson 1998, Zimmermann et al. 2000). Da das Knöllchen-Zentralgewebe auch vom Zentralzylinder der Wurzel durch eine Endodermis im Stadium II getrennt ist (Abb. III.1 O), ist auch eine Wasseraufnahme der infizierten Zone aus dem Wurzelcortex nur symplastisch möglich.

Barriere für gelöste Stoffe. Zur Aufklärung der Permeabilität des Knöllchen-cortex für gelöste Stoffe wurden in früheren Arbeiten unterschiedliche Infiltrationsstudien durchgeführt. Bereits Frazer (1942) infiltrierte *V. faba*-Knöllchen mehrere Tage mit einer Reihe saurer und alkalischer Farbstoffe und berichtete über den vollständigen Ausschluss der Farbstoffe durch die Knöllchenendodermis. Andere Arbeiten befassten sich fast ausschließlich mit

determinierten Knöllchen, ergaben aber ähnliche Ergebnisse. In *G. max*-Knöllchen penetrierte basisches Fuchsin die Scleroidschicht, eine der Knöllchenendodermis von *V. faba* analoge Struktur, nicht (Walsh et al. 1989b). In einer ähnlichen Studie von Streeter (1992) wurde die Penetration von vakuuminfiltiertem Azurblau, Fast Green und Safranin in *G. max*-Knöllchen durch eine „*single cell layer lacking intercellular spaces*“ (vermutlich Scleroidschicht) gestoppt. Bei Injektion des Tracers Lucifer Yellow CH in das Zentralgewebe von *G. max*-Knöllchen wurde auch dessen apoplastische Ausbreitung durch die Scleroidschicht begrenzt (Brown et al. 1995). Infiltrationsstudien belegen damit, dass die Knöllchenendodermis und analoge Strukturen wichtige Barrieren für gelöste Stoffe darstellen. Die Abriegelung des Zentralgewebes gegenüber der Wurzel durch eine Endodermis im Stadium II (Abb. III.1 O) verhindert auch eine Stoffdiffusion zwischen diesen Kompartimenten.

Barriere für Gase. Die Sauerstoffdiffusion ins Knöllchen muss stark begrenzt werden, um eine irreversible Inaktivierung der Nitrogenase zu verhindern. Es gibt Hinweise, dass sich eine Gasdiffusionsbarriere im Bereich des inneren Cortex befindet (1.6). Zur Untersuchung der Gaspermeabilität des Cortex indeterminierter Knöllchen infiltrierten Jacobsen et al. (1998) jene von *Medicago sativa* mit Joddampf. Nur suberin- und ligninfreie submeristematische Regionen des Knöllchencortex waren permeabel für das Gas, während es im restlichen Teil nur bis zur Knöllchenendodermis vordrang. Wenn sich O₂ genauso verhält wie I₂, könnte die Knöllchenendodermis, alternativ oder zusätzlich zum inneren Cortex, eine konstitutive Gasdiffusionsbarriere darstellen. Wenn die suberisierte Knöllchenendodermis als Gasdiffusionsbarriere dienen soll, muss sie *vor* einsetzender Nitrogenase-Genexpression vorhanden sein. Dies wurde in dieser Arbeit histologisch klar gezeigt, da sie bereits in der Infektionszone modifiziert war (Abb. III.1 I). In Analogie zur Knöllchenendodermis fungiert in Wurzeln von Feuchtlandpflanzen eine

Hypodermis als Gasdiffusionsbarriere. In diesem Gewebe sind suberinisierte Zellwände in Verbindung mit respiratorischem O₂-Verbrauch in der Lage, den O₂-Austritt in die Rhizosphäre komplett zu unterbinden (Armstrong et al. 2000).

Damit die Gasdiffusionsbarriere an kurzfristige Änderungen des O₂-Bedarfs im Knöllchen angepasst werden kann, muss der Diffusionswiderstand regulierbar sein. Oft wird von einer Änderung des Luftweges im gesamten inneren Cortex ausgegangen (1.6), wobei jedoch außer acht gelassen wird, dass der Gasaustausch wahrscheinlich punktuell stattfindet (Denison 1998). In determinierten *G. max*-Knöllchen erfolgt er beispielsweise durch Lenticellen, die sich über den Leitbündeln befinden (Brown und Walsh 1994, Jacobsen et al. 1998). Es wurde vorgeschlagen, dass osmotische Verhältnisse im vasculären System die Form dieser Cortexzellen und damit die Gasdiffusionswege beeinflussen können (1.6). Die variable Gasdiffusionsbarriere indeterminierter Knöllchen wurde bislang weniger intensiv bearbeitet. Denison (1998) und Jacobsen et al. (1998) betonen die Wichtigkeit nichtsuberinisierter submeristematischer Zonen für die Gasdiffusion in indeterminierte Knöllchen von *M. sativa*. In dieser Hinsicht könnte jedoch den erstmals in dieser Arbeit beschriebenen nichtsuberinisierten endodermalen Durchlasszellen (Abb. III.1 J), die ebenfalls nahe Leitbündeln liegen, eine entscheidende Bedeutung zukommen. Diese Vermutung wird unterstützt durch die Analogie mit Wurzeln, die eine suberinisierte Hypodermis besitzen (s.o.) und Sauerstoff durch unsuberinisierte Durchlasszellen („Fenster“) in die Rhizosphäre freisetzen (Armstrong et al. 2000). Die Zellform der endodermalen Durchlasszellen des Knöllchens könnte (ähnlich wie für innere Cortexzellen determinierter Knöllchen beschrieben (1.6)) osmotisch regulierbar sein. Damit würde die Knöllchenendodermis sowohl zum konstitutiven, als auch zum variablen Gasdiffusionswiderstand beitragen.

3.4.3 Symplastische Kontinuitäten im Knöllchen

3.4.3.1 Auftreten von Plasmodesmen

Im Cortex des Knöllchens sind apoplastische Barrieren vorhanden, die einen symplastischen Stofftransport erfordern. In innerem Cortex und infizierter Zone könnten sich Metabolite aber symplastisch oder apoplastisch bewegen. Da sich beide Transportwege bezüglich ihrer Regulierbarkeit grundsätzlich unterscheiden und in der Literatur keine detaillierten Daten zur symplastischen Kontinuität indeterminierter Knöllchen vorliegen, wurden im Rahmen dieses Projektes durch M.H. Abd-Alla (Assiut University, Ägypten) und H.-W. Koyro (Institut für Pflanzenökologie, JLU Gießen) die Häufigkeiten von Plasmodesmen zwischen unterschiedlichen Zelltypen des Knöllchens elektronenmikroskopisch ermittelt (Abd-Alla et al. 2000). Mit diesen Daten wurde ein Plasmodesmogramm erstellt (3.3.5). Folgerungen aus Plasmodesmenzählungen auf die symplastische Konnektivität sind nicht unumstritten. Sind Plasmodesmen vollständig abwesend, so kann mit Sicherheit von einer symplastischen Isolation ausgegangen werden. Sind jedoch Plasmodesmen vorhanden, kann damit noch keine Aussage über ihre Funktionalität und Größenausschlussgrenze (size exclusion limit) gemacht werden (van Bel und Oparka 1995). Beides kann sich während der Gewebedifferenzierung und durch externe Faktoren ändern (Patrick 1997). Im Großen und Ganzen stimmen jedoch Plasmodesmogrammvorhersagen und Tracerstudien, insbesondere in entwickeltem Gewebe, gut überein (van Bel und Oparka 1995).

Eine hohe Plasmodesmenhäufigkeit lag vor zwischen Zellen der vasculären Endodermis, des inneren Cortex und nicht-infizierten Zellen des Zentralgewebes (Abb. III.4). Infizierte Zellen waren an nicht-infizierte und innere Cortexzellen angebunden. Zwischen infizierten Zellen gab es jedoch fast keine Verbindungen. Da auch bei determinierten Knöllchen von *G. max* (Selker und

Newcomb 1985, Selker 1988, Brown et al. 1995) und *Phaseolus vulgaris* (Campos et al. 1996) eine wesentlich geringere Anzahl von Plasmodesmen in Paaren infizierter Zellen als in Kombinationen anderer Zelltypen beobachtet wurde, scheinen sich die Plasmodesmenhäufigkeiten determinierter und indeterminierter Knöllchen tendenziell gleich zu verhalten.

In keiner der bisherigen Studien wurde der Einfluss des Entwicklungsstadiums determinierter bzw. der Entwicklungszone indeterminierter Knöllchen auf symplastische Verbindungen untersucht. Plasmodesmendichte und -funktion können sich im Laufe der Entwicklung jedoch verändern, wie dies von Leitgeweben des Sprosses bekannt ist (Oparka und Roberts 2001). So findet in photosynthetisch aktiven Geweben von Monocotyledonen (z.B. Gerstenblatt, Haupt et al. 2001) beim Übergang vom Sink- zum Source-Zustand eine symplastische Isolation des Siebelement-Geleitzell-Komplexes statt. Auch bei Dicotyledonen erfolgt der Import ins Sinkblatt oft symplastisch, der Export aus dem Sourceblatt aber apoplastisch (Haupt et al. 2001). Da sich auch die Zentralgewebezelle des Leguminosenknöllchens nach der *Rhizobium*-Infektion von N-Sink zu N-Source entwickelt, sind disbezügliche Veränderungen auch dort denkbar.

3.4.3.2 Symplastischer Transport durch nicht-infizierte Zellen im Zentralgewebe?

Bei der Beurteilung eines symplastischen Weges im Zentralgewebe spielt die räumliche Anordnung der nicht-infizierten Zellen eine entscheidende Rolle (1.2). Diese Zellen bilden höchstwahrscheinlich einen bevorzugten Transportweg, da die Plasmodesmenhäufigkeit zwischen nicht-infizierten Zellen höher ist, als in jedem anderen Interface der infizierten Zone (Abb. III.4). Für Knöllchen von *G. max* wurde diese Hypothese durch eine

dreidimensionale Rekonstruktion von Serienschritten untermauert (Selker 1988). Nicht-infizierte Zellen bildeten Strahlen und Ebenen, die das infizierte Gewebe in mehrere Kompartimente unterteilten (Selker 1988). Da mit *V. faba*-Knöllchen bisher keine dreidimensionalen Rekonstruktionen vorgenommen wurden, kann eine mögliche strahlenförmige Anordnung nicht-infizierter Zellen nur vermutet werden. Deren häufiges Auftreten in Form kurzer Bänder oder Anhäufungen in (zweidimensionalen) Schnitten (Abb. I.1) unterstützt diese Annahme.

Im Zentralgewebe von *G. max*-Knöllchen hat jede infizierte Zelle Kontakt zu mindestens einer nicht-infizierten (Selker und Newcomb 1985). In *V. faba*-Knöllchen ist der Anteil nicht-infizierter Zellen jedoch wesentlich geringer (Abd-Alla et al. 2000). Daher ist eine direkte symplastische Verbindung aller infizierten Zellen zu Leitbündeln über eine Route nicht-infizierter Zellen unwahrscheinlich. Generell ist das Vorkommen nicht-infizierter Zellen im Zentralgewebe sehr variabel und abhängig von Symbiosepartnern (Brown und Walsh 1994) und Umwelteinflüssen (Roughley 1970, Roughley et al. 1976b, Arrese-Igor et al. 1993). Es ist unbekannt, ob eine geringere Dichte (oder ein Fehlen) nicht-infizierter Zellen von einer höheren Plasmosdesmendichte zwischen infizierten Zellen begleitet wird.

3.4.4 Die Rolle des äußeren Cortex

Die äußerste Gewebeschicht des *V. faba*-Knöllchens stellt keine Transportbarriere im eigentlichen Sinne dar, da sie aus einem locker angeordnetem Zellverband besteht (Abb. III.1 C, D). Sie wurde untersucht, da sie an die Knöllchenendodermis angrenzt und deren Funktion beeinflussen könnte. Zellwände des äußeren Cortex sind, insbesondere um Interzellularräume, verdickt, was diesem Gewebe die Funktion eines lacunaren Collenchyms

verleiht. Diese besteht darin, das dünnwandigere Gewebe des Knöllchenzentrums mechanisch zu stabilisieren. Mittels Sudan Red 7B-Färbung konnten in Freihandschnitten (Abd-Alla et al. 2000), jedoch nicht in dünneren Cryoschnitten (Abb. III.1 I-L) Suberineinlagerungen in Zellwänden des äußeren Cortex nachgewiesen werden. Diese wurden durch chemische Analysen (Hartmann et al. 2002) bestätigt. Die leichte Suberinisierung könnte antimikrobiellen Zwecken dienen (Peterson und Cholewa 1998) und aufgrund ihrer Hydrophobizität eine wasserabstoßende Oberfläche schaffen und damit eine Wasserfüllung der Interzellularen des äußeren Cortex verhindern. Da auch Knöllchen von *G. max*, *M. sativa* und *Trifolium repens* hydrophobe Oberflächen besitzen (Webb und Sheehy 1991), kommt dieser Eigenschaft für den Gasaustausch sicherlich eine wichtige Bedeutung zu.

Nach Chloroform/Methanol-Extraktion modifizierter Knöllchen- und Wurzelgewebe wurden ausschließlich in äußeren Cortexwänden außerdem hohe Mengen von Triterpenoiden (Betulin, Lupeol) gefunden (Hartmann et al. 2002). Diese Stoffe befinden sich oft an Grenzflächen oberirdischer Pflanzenteile (Cuticula), wo sie antimikrobiell wirken und den Wasserverlust reduzieren (Hayek 1989). Somit könnten neben der Suberinisierung auch Triterpenoide für die hydrophoben Eigenschaften des Knöllchencortex verantwortlich sein.

4 Isolation von Protoplasten aus dem Zentralgewebe des Knöllchens

4.1 Zielsetzung

Im Rahmen der in Kapitel 3 gefundenen strukturellen Gegebenheiten könnten sich Metabolite im infizierten Zentralgewebe des Knöllchens symplastisch oder apoplastisch bewegen. Für letzteren Prozess ist die Aktivität von Transportern in Plasmamembranen erforderlich. Dieser Prozess kann in der Regel mit isolierten Plasmamembranvesikeln untersucht werden (Bush 1993), was jedoch bei Knöllchen-Zentralgewebe aus zwei Gründen nicht möglich ist: Im Knöllchen-Zentralgewebe sind infizierte und nicht-infizierte Zellen mit vermutlich unterschiedlichen Transportaktivitäten nebeneinander vorhanden, und die Plasmamembran ist mit gewöhnlichen Methoden (two phase partitioning) nicht von der Peribacteroidmembran infizierter Zellen trennbar, da sich beide sehr ähnlich sind (Christiansen et al. 1995). Alternativ bot sich die Isolation und Separation von Protoplasten zur Durchführung von Aufnahmestudien an. Da anfängliche Versuche, infizierte Protoplasten nach in der Literatur beschriebenen Protokollen zu isolieren, fehlschlagen, mußten neue Methoden zur Isolation und Separation von Protoplasten beider Zelltypen entwickelt werden. Die Vitalität und Struktur des isolierten Materials wurde licht-, fluoreszenz- und elektronenmikroskopisch untersucht, um dessen Eignung für Transportstudien zu belegen.

4.2 Material und Methoden

4.2.1 Chemikalien

Bezeichnung	Formel	Reinheit	Firma	No.
L-Ascorbinsäure	$C_6H_8O_6$		Sigma	A7506
Betain	$C_5H_{11}NO_2$		Sigma	B2629
Bovines Serumalbumin		>96%	Sigma	A6003
Calciumchlorid	$CaCl_2$	p.a.	Merck	102382
Calciumsulfat	$CaSO_4$	puriss. p.a.	Fluka	21246
Cefotaxim	$C_{16}H_{16}N_5O_7S_2Na$	~95%	Sigma	C7912
Cellulase Onozuka R-10			Serva	16419.03
Cellulase Onozuka RS			Yakult	L0011
Cellulase Cellulysin			Calbiochem	219466
Chloramphenicol	$C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$	PCCT	Sigma	C1919
Dextransulfat Natriumsalz (MW 500 000)			Fluka	31403
Driselase		PCCT	Sigma	D8037
Ficoll (Type 400)			Sigma	F4375
Fluorescent Brightener 28 (Calcofluor White M2R)		PCCT	Sigma	F3397
Fluorescein-Diacetat		PCCT	Sigma	F1397
Hemicellulase			Sigma	H7649
HEPES (N-[2-Hydroxyethyl]- piperazin-N'-[2-ethansulfon- säure])	$C_8H_{18}N_2O_4S$	>99,5%	Sigma	H3375
Kaliumhydroxid, Plättchen	KOH	p.a.	Merck	105033
Kaliumjodid	KI	puriss. p.a.	Fluka	60400
Kaliumnitrat	KNO_3	puriss. p.a.	Fluka	60419
Kaliumsulfat	K_2SO_4	puriss. p.a.	Fluka	60532
Kupfersulfat	$CuSO_4 \cdot 5 H_2O$	puriss. p.a.	Fluka	61240
Lugols Lösung		f. Mikr.	Merck	109261
Lysozym			Merck	105281
Macerozyme R-10			Serva	28302.03
Magnesiumsulfat	$MgSO_4 \cdot 7 H_2O$	puriss. p.a.	Fluka	63140
D-Mannitol	$C_6H_{14}O_6$	PCCT	Sigma	M1902
2-Mercaptoethanol	C_2H_6OS		Sigma	M6250
MES (2-[N-Morpholino]- ethansulfonsäure)	$C_6H_{13}NO_4S$	>99,5%	Sigma	M8250
Natriumdodecylsulfat (SDS)	$C_{12}H_{25}O_4SNa$	99%	Sigma	L4509

Neutralrot	$C_{15}H_{17}ClN_4$		Merck	101369
Pectinase		pract.	Serva	31660
Pectolyase Y-23			Seishin	
Polyclar AT		pract.	Serva	33162.01
Polymyxin B sulfat			Serva	47976
Polyvinylpyrrolidon	PVP 10	PCCT	Sigma	P2307
Propidiumjodid	$C_{27}H_{34}N_4I_2$	>95%	Sigma	P4170
Rhodamine-123			MP	r-302
D-(+)-Saccharose	$C_{12}H_{22}O_{11}$	>99%	Fluka	84100
D-Sorbitol	$C_6H_{14}O_6$	PCCT	Sigma	S8143
Thimerosal	$C_9H_9HgO_2SNa$	>97%	Sigma	T5125

Für alle Lösungen, Puffer, Medien etc. wurde hochaufgereinigtes (Milli-Q, Millipore, Eschborn) entionisiertes Wasser verwendet.

4.2.2 Erste Ansätze zur Isolation infizierter Protoplasten

Als Ausgangspunkt der Entwicklung eines Protokolls zur Isolation von Protoplasten aus dem infizierten Knöllchen-Zentralgewebe von *V. faba* wurden zunächst leicht modifizierte Methoden nach Broughton et al. (1976) und Hanks et al. (1983) getestet. Frisch abgetrennte Knöllchen wurden mit dest. Wasser abgespült und mit einer Rasierklinge unter Waschmedium (WM) I (600 mM Sorbitol, 50 mM MES, 1 mM KNO_3 , 1 μM KI, 0,1 μM $CuSO_4$, pH 5.8 mit KOH) in kleine Stücke geschnitten. Diese wurden mit WM I gewaschen und 12 h bei 25°C in Enzymsuspension (ES; 10 mL g^{-1} Knöllchenfrischmasse) unterschiedlicher Zusammensetzung (15-30 mg mL^{-1} Cellulase Onozuka R-10, 5-10 mg mL^{-1} Macerozyme R-10, 50 U mL^{-1} Hemicellulase, 3 mg mL^{-1} Na-Dextransulfat, 10 mg mL^{-1} BSA in WM I) randschüttelnd (40 Umdr. min^{-1}) inkubiert. Nach dem Zellwandverdau wurden ES und verdautes Gewebe mit WM I durch ein 100 μm Stahlnetz in ein Zentrifugenröhrchen (50 mL) gewaschen und mit einem Swing-out-Rotor (222.72.V01, in Z-320 Zentrifuge, Hermle, Wehingen) zentrifugiert (1 min, 40 g). Das Pellet wurde mehrmals gewaschen durch

Absaugen des Überstandes und vorsichtiges Resuspendieren mit frischem WM I.

Da diese Methode nicht zu intakten infizierten Protoplasten führte (siehe 4.3.4), wurde eine Zweischnitt-Methode getestet (Hoh und Broughton 1975, Wooi und Broughton 1979). Dazu wurden wie oben präparierte Knöllchenstücke zunächst 6 h in cellulasefreier ES I (10 mg mL⁻¹ Macerozyme, 10 mg mL⁻¹ BSA in WM I) schüttelnd inkubiert (25°C, 40 Umdr. min⁻¹) und durch ein 280 µm Stahlsieb passiert, um unverdautes Cortextgewebe abzutrennen. Nach zweimaligem Waschen mit WM I wurde das mazerierte Gewebe 12 h in ES II mit unterschiedlichen Cellulasen (50 mg mL⁻¹ Cellulase Onozuka R-10 oder Cellulysin, 50 U mL⁻¹ Hemicellulase, 10 mg mL⁻¹ BSA in WM I) inkubiert (25°C, 40 Umdr. min⁻¹). Da auch diese Modifikationen nicht zu intakten infizierten Protoplasten führten, wurde die Zweischnitt-Methode nicht weiter verfolgt.

4.2.3 Methode zur Isolation und Separation sphärischer infizierter und nicht-infizierter Protoplasten aus dem Knöllchen-Zentralgewebe

Da konventionelle Isolationsprotokolle auch mit leichten Modifikationen nicht zur Freisetzung sphärischer Protoplasten aus dem infizierten Zentralgewebe führten, wurde eine grundlegend neue Methode entwickelt, deren Entwicklungsschritte in 4.3.2 beschrieben sind. Für die in 5.2.4-6 beschriebenen Experimente wurden Protoplasten schließlich nach folgendem standardisiertem Protokoll isoliert. Die Schritte sind in Abb. IV.2 dargestellt.

4.2.3.1 Medien

Die für Protoplastenisolation und -separation entwickelten Suspensionsmedien SM (Tab. IV.1) wurden auf Basis eines Basalmediums BM hergestellt, das sich zusammensetzte aus (in mM) 1,0 MgSO_4 , 0,5 CaCl_2 , 10 MES, 2,0 Ascorbinsäure und 5,0 KOH, was einen pH von 5,60 ergab. Die Enzymsuspension (ES) auf Basis von SM 1 enthielt (in mg mL^{-1}) 30 Cellulase Onozuka RS, 10 Pectinase, 10 Driselase, 1,0 Pectolyase Y-23, 5,0 BSA und besaß eine Osmolalität von 550 mOsM. Sie wurde hergestellt durch einstündiges Überkopfschütteln bei 4°C, Abzentrifugation des unlöslichen Rückstandes (5 min, 3000 *g*) und anschließende Sterilfiltration (0,22 μm). Der pH-Wert der ES wurde mit HCl erneut auf 5,60 eingestellt. Zur Protoplastenseparation wurden Medien unterschiedlicher Dichte, aber ähnlicher Osmolalität durch Mischen von SM 2b und Ficollmedium (FM) erhalten. Die Osmolalitäten aller Medien wurden kryoskopisch mit einem Mikro-Osmometer (Röbling, Berlin) bestimmt. Die Medien wurden auf Vorrat hergestellt und bei -20°C gelagert.

Tab. IV.1. Zusammensetzung und Osmolalitäten der Suspensionsmedien SM und des Ficollmediums FM auf Basis des Basalmediums BM (Zusammensetzung siehe Text).

Medium	SM 1	SM 2a	SM 2b	FM
CaSO ₄ [mM]	4,5			
Betain [mM]	340	225	365	280
Ficoll 400 mg mL^{-1}		10		200
<i>mOsM</i>	<i>380</i>	<i>260</i>	<i>410</i>	<i>425</i>

4.2.3.2 Aufbau des Dichtegradienten

Zur Separation von Protoplasten wurde ein gestufter isoosmotischer Dichtegradient (aus SM 2b+FM, s. 4.2.3.1) verwendet, über dem sich eine leicht hypotone Freisetzungsschicht (SM 2a) befand (Abb. IV.1). Die beste Trennung der Phasen wurde erreicht durch langsames Unterschichten mittels einer bis zum Boden reichenden Kanüle (0,8·120 mm), die an einer peristaltischen Pumpe (Ismatec, Wertheim) angeschlossen war.

mOsM	mL	% Ficoll
260	7,0	1,00
415	4,5	1,25
420	7,0	12,75
425	5,5	20,00

Abb. IV.1. Aufbau des kombinierten Stufengradienten zur Freisetzung und Separation von Protoplasten aus dem Zentralgewebe von *V. faba*-Knöllchen.

4.2.3.3 Isolation und Separation der Protoplasten

Wurzelsysteme von *V. faba*-Pflanzen aus Nährlösungskultur (2.2.3) wurden vom Spross getrennt, mit Leitungswasser abgespült und in diesem gelagert. Vom Wurzelsystem entfernte Knöllchen wurden unter einem Binokular mit SM 1 bedeckt und mit Hilfe einer Präzisionspinzette (Dumont, Schweiz) und einer an einem Skalpellhalter montierten Rasierklinge (Wilkinson-Sword, Solingen) in Cortex und infiziertes Zentralgewebe dissektiert (Abb. IV.2 A). Der apikale (meristematische) und basale (senescente) Teil des Zentralgewebes wurde verworfen. Unmittelbar nach der Dissektion wurde das Gewebe auf

ein in SM 1 befindliches Nylonnetz (60 μm Maschen) überführt (Abb. IV.2 B, C), das mittels Epoxidharz an einem PE-Ring (Stück einer 20 mL-Einwegspritze) befestigt war. Nach der Präparation (ca. 80-100 Knöllchen) wurden die Zentralgewebestücke mit 30 mL SM 1 gespült und anschließend auf dem Netz in 3 mL ES überführt, welches mit einem Mikro-Magnetührstab (2 mm) leicht bewegt wurde (Abb. IV.2 D). Durch einen im PE-Ring befestigten, belüfteten Spritzenkolben, der verschiebbar in einem Schnappdeckel gelagert war (Abb. IV.2 E), wurde das Netz über der Bodenoberfläche gehalten (Abb. IV.2 F).

Nach 3 h Inkubation (28°C) wurde das Netz mit den noch kohärenten Gewebestücken vorsichtig aus dem ES genommen und zur Entfernung beschädigter Zellen an den Schnittflächen kurz in SM 2b und SM 2a getaucht. Danach wurde es vorsichtig in die oberste, hypotone Phase des kombinierten Gradienten (Abb. IV.1, IV.2 G) überführt, 15 min dort belassen und anschließend in 10-minütigen Abständen sehr langsam auf und ab bewegt. Dies führte zur kontinuierlichen Freisetzung von Protoplasten (Abb. IV.2 H). Die Protoplasten gelangten durch Schwerkraft innerhalb weniger Sekunden in den darunterliegenden isotonen Bereich des Gradienten (Abb. IV.2 I). Nach der Freisetzungszeit (60 min) wurde der Gradient in einem Swing-out-Rotor (222.72.V01, in Z-320 Zentrifuge, Hermle) 13 min bei 15 *g* zentrifugiert. Kugelförmige infizierte und nicht-infizierte Protoplasten sammelten sich zwischen in den Phasengrenzen 1,25/12,75% bzw. 12,75/20,00% Ficoll, während nicht-sphärische infizierte Protoplasten in die 20%-Phase wanderten (Abb. IV.2 J). Die Fraktionen wurden mit einer 2 mL PE-Pasteurpipette (abgeschnittene Spitze) vom Interface abgesaugt und in ein PS-Rundboden-Zentrifugenröhrchen gegeben.

Zur Entfernung des Ficolls wurden die Protoplasten dreimal durch Unterschichten mit SM 2b gewaschen. Zwischen den Waschschritten wurden die

nicht-infizierten Protoplasten durch Zentrifugation (7 min, 20 *g*), die infizierten durch Schwerkraftsedimentation (20 min) pelletiert (Abb. IV.2 K, L). Nach dem letzten Waschschrift wurden die Protoplasten in das benötigte Volumen Medium aufgenommen (für Aufnahmeexperimente: nicht-infizierte Protoplasten in SM 2b, infizierte in SM 2b-FM-Mischung mit 10% Ficoll).

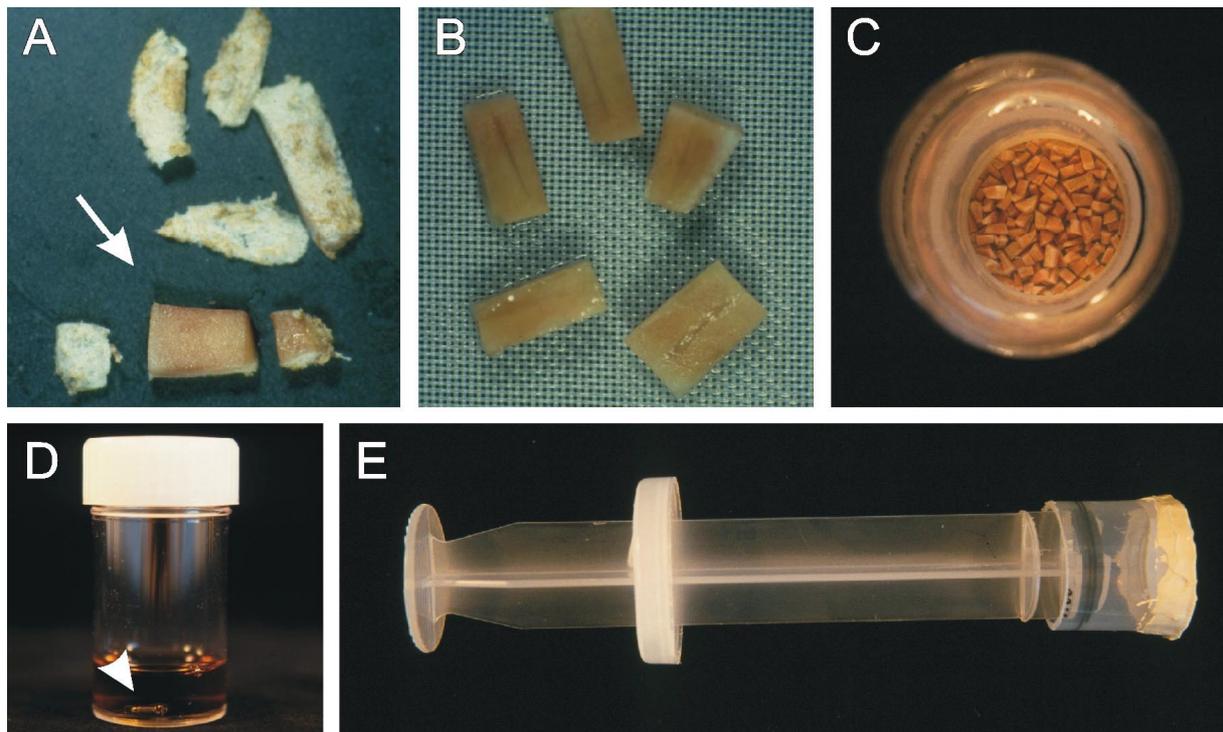


Abb. IV.2. A-F. Sezierung und Verdau von Zentralgewebe aus *V. faba*-Knöllchen. **A.** Vor dem Verdau wurden Cortex, Apex und Basis vom Zentralgewebe (Pfeil) entfernt. **B.** Sezierte Zentralgewebestücke wurden auf einem Nylonnetz gesammelt. **C.** Für Aufnahmeversuche wurden 80-100 Knöllchen seziert und gemeinsam verdaut. **D.** Enzymsuspension mit Mikro-Rührfisch (Pfeilspitze). **E.** Vorrichtung für Halterung und Transfer des Nylonnetzes.

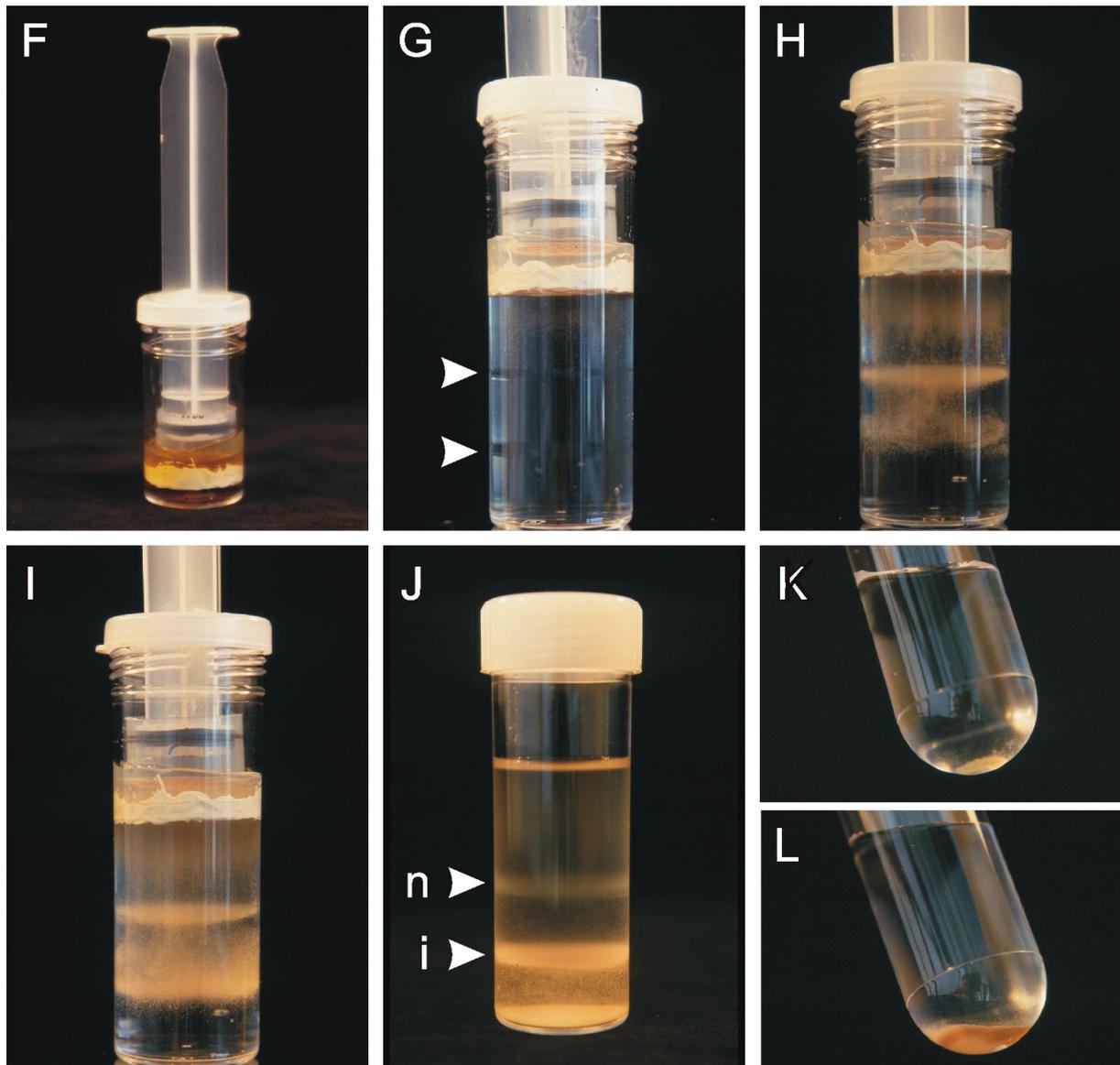


Abb. IV.2 (Fortsetzung). F. Inkubation des seziierten Gewebes (C) mittels Vorrichtung (E) in Enzymsuspension (D). **G-L.** Freisetzung und Separation von nicht-infizierten und infizierten Protoplasten. **G.** Das verdaute Gewebe wurde in die obere Phase eines Dichte- und osmotischen Gradienten gebracht (Pfeile: Phasengrenzen 1,25/12,75% und 12,75/20,00% Ficoll). **H.** Nach 15 min Freisetzung waren Protoplasten als Wolken erkennbar, die sich an Phasengrenzen stauen. **I.** Protoplasten wurden über einen Zeitraum von 60 min freigesetzt. **J.** Gradient nach Zentrifugation: Banden nicht-infizierter (n) und infizierter (i) Protoplasten sind erkennbar. **K.** Fraktion infizierter Protoplasten aus J, i. **L.** Fraktion nicht-infizierter Protoplasten aus J, n.

4.2.4 Quantifizierung der Protoplastenausbeute

Während der Entwicklung der neuen Isolationsmethode wurden verschiedene Parameter zur Überprüfung der Ausbeute und Vitalität der Protoplasten untersucht. Als Bezugsgröße für die Ausbeute wurde die Frischmasse des Ausgangsmaterials durch zügiges Wiegen des Zentralgewebeblocks nach Entfernung des Knöllchencortex bestimmt. Als praktikables Maß zur Abschätzung der Gesamtausbeute (intakte und defekte Protoplasten) erwies sich das gepackte Zellvolumen (PCV). Dieses wurde durch Aufsaugen des Protoplastenpellets in eine Hämatokritkapillare (70 μL) und anschließende Zentrifugation (3 min, 200 g) in einem Hämatokritrotor (220.58, in Z-320 Zentrifuge, Hermle) ermittelt.

Der Anteil verschiedener Protoplastentypen (nicht-infiziert/infiziert; nicht-sphärisch/sphärisch) in Protoplastensuspensionen wurde durch mikroskopische Auszählung mit einer Zählkammer nach Fuchs-Rosenthal (Hirschmann, Eberstadt) bestimmt.

4.2.5 Färbemethoden für Vitalitätstests und Stärkenachweis

Zur Färbung lebender Zellen („life stain“) mit Fluorescein-Diacetat (FDA) wurden 50 μL Protoplastensuspension mit 1 μL FDA-Lösung (5 mg mL^{-1} in Aceton) auf einer Zählkammer nach Fuchs-Rosenthal vermischt. Zur Färbung toter Zellen („dead stain“) mit Propidiumjodid (PI) wurden 45 μL Suspension mit 5 μL PI-Lösung (2,5 μg mL^{-1} in aq.) versetzt. Nach einigen Minuten Inkubationszeit wurde die Zahl fluoreszierender und nichtleuchtender, sowie sphärischer und deformierter Zellen mit der unter 3.2.3 beschriebenen Ausstattung licht- und fluoreszenzmikroskopisch bestimmt. Die Neutralrotak-

kumulation in Protoplastenvakuolen wurde durch Mischung (1:1) der Protoplastensuspension mit einer Neutralrot-Lösung (5 mg mL^{-1}) untersucht. Zum Nachweis von Stärke in Protoplasten wurde die Protoplastensuspension auf einem Objektträger mit Lugolscher Lösung gemischt (1:10) und mikroskopiert.

4.2.6 Untersuchung der Struktur isolierter Protoplasten mittels Transmissionselektronenmikroskopie

Die TEM von Zentralgewebe-Protoplasten wurde nach einer modifizierten Agarosesandwichmethode durchgeführt, wobei die Fixierung ähnlich wie bei Ehlers und Kollmann (1996) beschrieben erfolgte. Zum Zellwandverdau wurde zunächst das seziierte Zentralgewebe zweier Knöllchen transversal halbiert. Apikale und basale Hälften wurden getrennt auf ein Nylonnetz ($60 \mu\text{m}$; an Plastikring, $5 \text{ mm } \varnothing$) gegeben und 4,5 h in Enzymsuspension inkubiert (28°C , nicht-schüttelnd, Medien wie in 4.3.2.6). Das Netz mit dem mazerierten Gewebe wurde auf einen osmotischen Gradienten analog 4.3.2.7 ($260/370 \text{ mOsM}$) gegeben, der sich in einer blauen Eppendorfspitze mit geweitetem Hals befand, die mit $100 \mu\text{L}$ low-melting Agarose (20 g L^{-1}) gefüllt war (Abb. IV.3). Die freigesetzten Protoplasten lagerten sich auf der Agaroseschicht ab. Nach Absaugen des Überstandes wurden die Protoplasten mit flüssiger low-melting Agarose (35°C) überdeckt. Nach deren Abkühlung wurde das Protoplasten-enhaltende Stück der Pipettenspitze (5 mm) abgeschnitten und in Protoplastenwaschpuffer (PWB; 270 mM Suc , 15 mM MES in vereinfachtem Basalmedium lt. 4.3.2.6, $\text{pH } 6,2$ mit KOH , 350 mOsM) gegeben. Diese „Protoplasten-Sandwiches“ wurden 2 h bei 20°C fixiert (30 g L^{-1} Glutaraldehyd in PWB), mit PWB gewaschen (auf Eis, $3 \times 10 \text{ min}$) und 1,5 h auf Eis nachfixiert (2 mL OsO_4 (40 g L^{-1}) in 2 mL PWB). Die Agaroseblöcke wurden auf Eis in einer aufsteigenden Ethanolreihe teilentwässert (30%, 50%, 70%,

jeweils 2 x 15 min), über Nacht bei 4°C gelagert und am nächsten Morgen bei 20°C vollständig entwässert (90%, 96%, 99,5%, 100%, jeweils 2 x 15 min). Nach Austausch des Ethanols gegen Propylenoxid (3 x 15 min) wurde diesem über 9 h tropfenweise mittelharte Spurr-Harzmischung (Spurr 1969) zugegeben (auf Rundschüttler). Die Harz-Propylenoxid-Mischung wurde anschließend durch Spurr-Harz ersetzt und über Nacht infiltriert. Nach zweimaligem Austausch des Harzes (je 60 min Infiltration) wurden die Blocks einzeln in harzgefüllte Gelatinekapseln gegeben und 24 h bei 68-70°C polymerisiert.

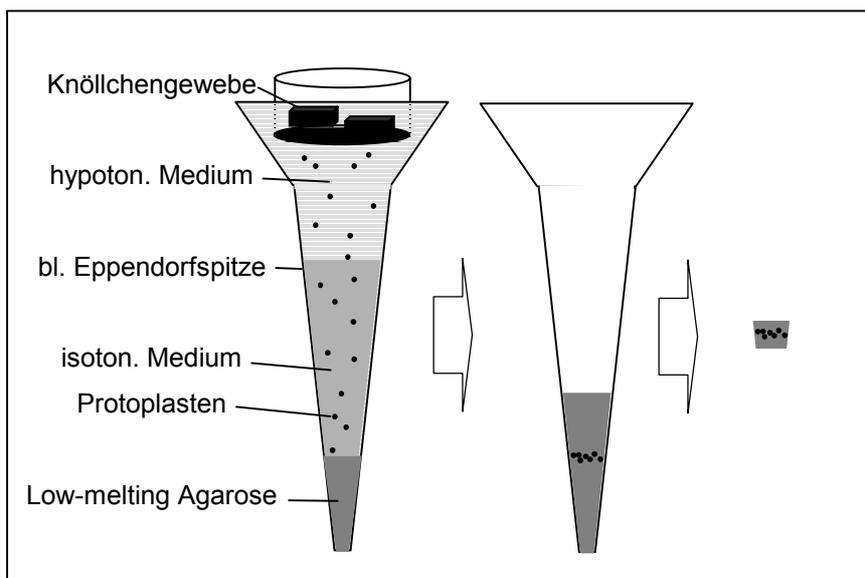


Abb. IV.3.

Versuchsaufbau zur Herstellung von Agarosesandwiches mit Zentralgewebe-Protoplasten.

Für lichtmikroskopische Voruntersuchungen wurden mit selbstgefertigten Glasmessern (Knifemaker 7801 A, LKB) und einem Ultramikrotom (Ultratome II, LKB) Semidünnschnitte (0,5-1 μm) angefertigt und mit Toluidinblau (5 g L⁻¹ in 0,1 M PBS; pH 7,4) gefärbt. Für TEM wurden mit einem Diamantmesser Ultradünnschnitte (60-90 nm) angefertigt und auf Formvarbeschichtete Cu-Grids (150 mesh; Agar Scientific, Stansted, UK) gezogen.

Sie wurden 30 min mit Uranylacetat (20 g L^{-1} in EtOH) und 10 min mit Bleicitrat ($0,2 \text{ g L}^{-1}$) kontrastiert (Reynolds 1963) und mit einem Philips EM 300 Transmissionselektronenmikroskop betrachtet und fotografiert.

4.2.7 Isolation von Protoplasten aus dem Zentralgewebe von *Glycine max*-Knöllchen

Es wurde untersucht, ob die neu entwickelte Isolationsmethode auch bei determinierten Leguminosenknöllchen zu sphärischen, osmotisch aktiven Protoplasten führt. Dazu wurde das Zentralgewebe von Knöllchen sechs Wochen alter Sojapflanzen mit den in 4.2.3.1 genannten Medien nach dem in 4.2.3.3 beschriebenen System verdaut. Protoplasten wurden wie in 4.2.3.3 freigesetzt. Infizierte Protoplasten wurden mit Propidiumjodid gefärbt und fotografiert (4.2.5).

4.3 Ergebnisse

4.3.1 Erste Ansätze zur Isolation infizierter Protoplasten

Bei ersten Versuchen, infizierte Protoplasten mit in der Literatur beschriebenen Methoden zu isolieren (4.2.2), wurde im Laufe des Gewebeverdaus eine sehr starke Verbräunung des Mediums beobachtet (Abb. IV.4 A). Diese wurde auf Oxidation von aus dem Knöllchencortex freigesetzten phenolischen Verbindungen (Tannine) zurückgeführt und konnte durch Zusatz von 1 mM 2-Mercaptoethanol verhindert werden. Da dieses Reduktionsmittel bei einer *Daucus carota*-Suspensionskultur jedoch phytotoxisch wirkte (FDA-Test, Daten nicht gezeigt), wurde von dessen Verwendung bei der Protoplasteniso-

lation abgesehen. Mittels löslichem oder unlöslichem Polyvinylpyrrolidon (PVP) wurde versucht, die freigesetzten Tannine zu binden (Loomis und Battaile 1966, Andersen und Sowers 1968), um mögliche negative Effekte auf die isolierten Zellen und die zellwandverdauenden Enzyme auszuschließen. Der Zusatz von PVP zur Enzymsuspension verminderte deren Verbräunung jedoch kaum. Die nach konventionellen Methoden isolierten infizierten Protoplasten hatten immer eine unregelmäßige Form und waren nicht osmotisch aktiv (Abb. IV.4 B).

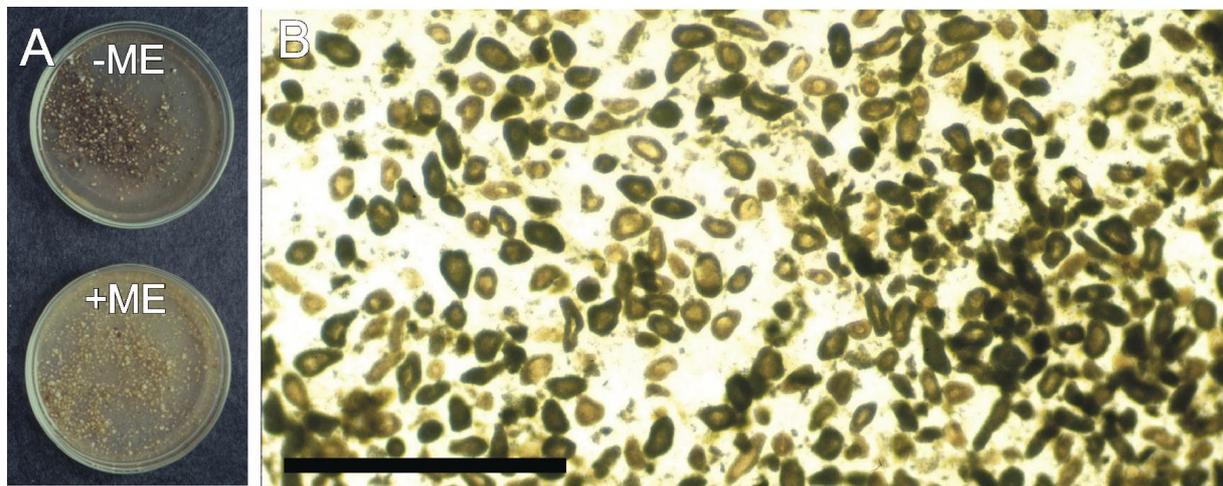


Abb. IV.4. A. Verbräunung von Medium und zerschnittenem Knöllchengewebe bei Abwesenheit (-ME) und Anwesenheit (+ME) von 2-Mercaptoethanol (1 mM). B. Fraktion infizierter „Protoplasten“, die nach konventioneller Methode isoliert wurde. Balken: 500 μm .

4.3.2 Schritte zu einem neuen Protokoll zur Isolation und Separation sphärischer Protoplasten aus dem Knöllchen-Zentralgewebe

Mehrere Indizien sprachen dafür, dass die nach konventionellen Methoden isolierten infizierten Protoplasten nicht intakt waren (siehe 4.4). Die

Entwicklungsschritte, die von der ursprünglichen Methode (4.2.2) zu einer völlig neuen, in 4.2.3 beschriebenen Isolationsmethode führten, werden im folgenden erläutert.

4.3.2.1 Modifikation der Gewebepräparation

Es war erforderlich, die Freisetzung von Tanninen aus Cortexzellen in die Enzymsuspension (ES) zu eliminieren. Da eine Bindung der Tannine an PVP nicht befriedigend war, erwies sich als einzig geeignete Methode die aufwändige manuelle Entfernung des Knöllchencortex vor dem Zellwandverbau (Abb. IV.2 A).

4.3.2.2 Modifikation von Zusammensetzung und Osmolalität der Medien

Zu Beginn der Methodenentwicklung wurde als Basalmedium zunächst ein modifiziertes B5-Gewebekulturmedium (Gamborg und Phillips 1995) mit 10 mM MES (pH 5.6 mit KOH) verwendet, das bereits erfolgreich zur Isolation von Protoplasten aus anderen Geweben eingesetzt worden war (Neumann 1995). Die Osmolalitäten der Protoplastenmedien wurden mit Mannitol und Sorbitol (1:1) eingestellt. Die ES-Zusammensetzung wurde modifiziert zu (in mg mL^{-1}) 30 Cellulase Onozuka R-10 (Serva), 10 Driselase (Sigma) und 10 Pectinase (Serva). Diese Modifikationen führten jedoch nicht zur Freisetzung sphärischer Protoplasten.

Ein Schlüssel zur Isolation kugelförmiger, osmotisch aktiver Protoplasten war die drastische Reduzierung der Osmolalität der Enzymsuspension (ES) in Verbindung mit nicht-schüttelnder Inkubation. Die Verminderung der ES-Osmolalität von ca. 900 mOsM auf ca. 400 mOsM in Verbindung mit einer

nicht-schüttelnden 12-stündigen Inkubation bei 28°C führte erstmals zu einer Freisetzung einiger sphärischer infizierter Protoplasten. Diese waren osmotisch aktiv und platzten oder deformierten bei Wasserzugabe zum Medium (Abb. IV.5 A, B).

Mit dieser Methode wurden aus verdautem Gewebe jedoch nur sehr wenige Protoplasten freigesetzt. Es wurde vermutet, dass in der Zellwand von Knöllchen ein Strukturelement vorliegt, das von den eingesetzten Enzymen nicht angegriffen werden kann. Testweiser Zusatz von 1% Lysozym (degradiert bakterielle Zellwände) oder 1% Macerozym (Pectinase-Mischung) zur ES erhöhte die Freisetzung infizierter Protoplasten nicht. Daher wurde zunächst versucht, die Ausbeute auf anderen Wegen zu erhöhen.

4.3.2.3 Zeitliche Trennung von Gewebeerddau und Protoplastenfreisetzung

Eine deutlich erhöhte Ausbeute (nach Abschätzung) wurde schließlich erzielt durch die zeitliche Trennung von Gewebeerddau und Protoplastenfreisetzung. Dazu wurde das Knöllchen-Zentralgewebe zunächst in einer hypertonen ES (1600 mOsM) auf Basis von B5-Gewebekulturmedium 12 h nicht-schüttelnd verdaut, wobei sich das makroskopische Aussehen des Gewebes nicht veränderte. Anschließend Absenkung der Osmolalität auf 300 mOsM durch Zugabe von deion. Wasser führte zu einer selbständigen Freisetzung kugelförmiger infizierter und nicht-infizierter Protoplasten aus dem kohärenten Gewebe (Abb. IV.5 C). Desintegration des verdauten Gewebes durch Pipettieren, Zerstoßen oder Schütteln, sowie Osmolalitäten von über 500 mOsM bei der Freisetzung führten dazu, dass keine kugelförmigen infizierten Protoplasten freigesetzt wurden.

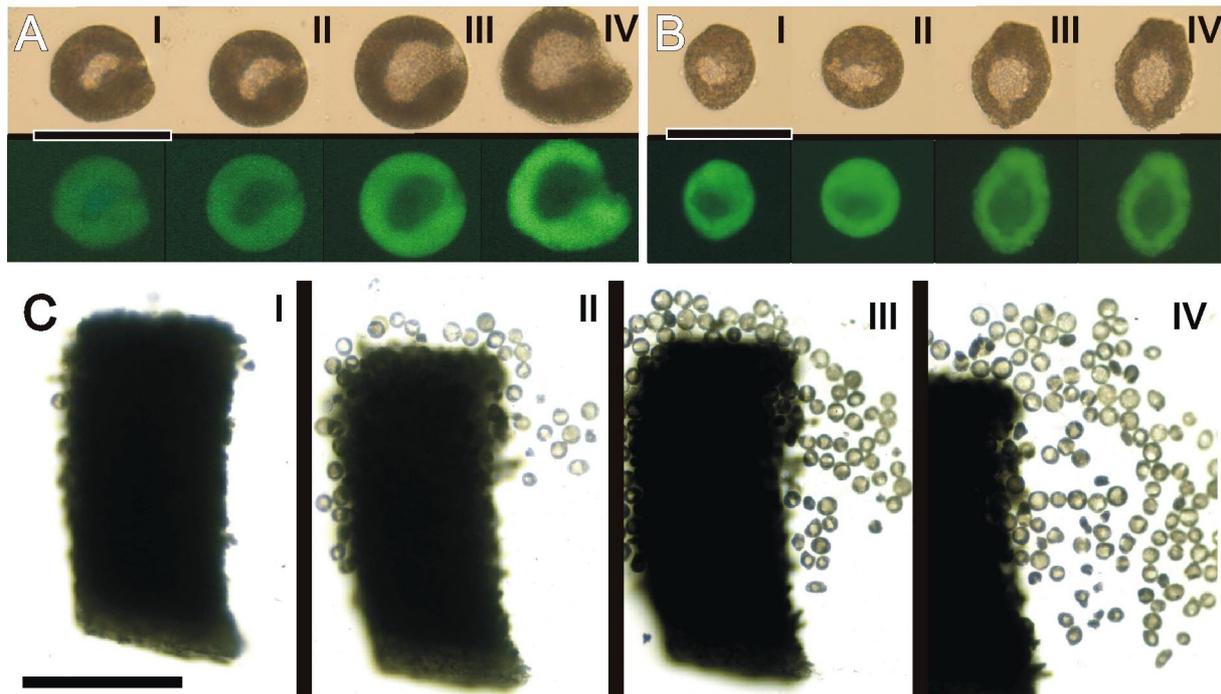


Abb. IV.5. Isolation infizierter Protoplasten. **A, B.** Zeitreihe von Expansion und Platzen (A) bzw. Deformation (B) eines plasmolysierten infizierten Protoplasten. Protoplasten zeigen auch nach dem Platzen FDA-Fluoreszenz. oben: Hellfeld; unten: FDA-Färbung, UV-Fluoreszenz. Balken: 100 μm . **C.** Freisetzung von sphärischen infizierten Protoplasten aus verdautem Zentralgewebe. Das Gewebe wurde in einer hypertonen Enzymsuspension verdaut, deren Osmolalität anschließend durch Wasserzugabe reduziert wurde. Balken: 500 μm .

4.3.2.4 Räumliche Trennung von Gewebeverdau und Protoplastenfreisetzung

Ein Problem der neuen Methode bestand darin, dass die Absenkung der Osmolalität und damit die Freisetzung der Protoplasten in der ES erfolgten. Außerdem befanden sich in dieser neben den kugelförmigen Protoplasten auch defekte sowie die angedauten Gewebestücke. Zur Trennung von Geweberesten und freigesetzten Protoplasten wurden die dissektierten Zentralgewebestücke vor dem Verdau auf einem Nylonnetz (60 μm) gesammelt, das sich in hypertonischem Suspensionsmedium (SM I; 1400 mOsM) befand (Abb.

IV.2 C). Die Gewebestücke konnten auf diesem Netz gleichzeitig und berührungslos zum Verdau in hypertonsche ES (1600 mOsM) und danach zur Freisetzung in ein leicht hypotonisches Medium (SM II; 300 mOsM) überführt werden (Abb. IV.2 F, G).

4.3.2.5 Optimierung der Inkubationsbedingungen

Durch die folgenden Veränderungen der Verdaubedingungen konnte eine weitere deutliche Steigerung der Ausbeute (mikroskopisch abgeschätzt) erreicht werden: a. Eine Variation der Verdaudauer zeigte, dass bereits bei Inkubationszeiten über 6 h die Menge freigesetzter kugelförmiger infizierter Protoplasten deutlich abnahm, d.h. eine lange Verdauzeit sich negativ auf die Vitalität auswirkte. b. Die Ausbeute kugelförmiger Protoplasten konnte außerdem durch Reduktion der ES-Osmolalität auf 700 mOsM (d.h. weniger hypertonsch) deutlich erhöht werden. c. Äußere, meist beschädigte Zellen konnten entfernt werden durch kurzes Eintauchen des Netzes mit dem verdauten, noch kohärenten Gewebe in Suspensionsmedium, was auch die Verschleppung von ES in das Freisetzungsmedium verhinderte.

Durch Hämatokritzentrifugation (4.2.4) wurde ermittelt, dass mit der bis dahin entwickelten Methode eine Gesamtausbeute von 0,4-0,6 μL gepacktem Zellvolumen (PCV) pro mg Gewebe-FM erzielt wurde (Ansatz: 50 mg Gewebe-FM in 3 mL ES; 3,5 h Verdau). Dabei spielte es keine Rolle, ob das Gewebe vor der Inkubation in kleine oder größere Stücke zerschnitten wurde. Da feines Zerschneiden zu sehr viel Zellbruch führte, wurden zukünftig Zentralgewebestücke vor dem Verdau nur 1-2 mal zerteilt.

4.3.2.6 Weitere Modifizierung von Basal-, Suspensions- und Enzymmedien

Nach den in 4.3.2.3-5 dargestellten Veränderungen wurde versucht, durch geänderte Medienzusammensetzungen die Ausbeute an sphärischen infizierten Protoplasten weiter zu erhöhen.

Das zunächst zur Methodenentwicklung eingesetzte Basalmedium beruhte auf einem B5-Gewebekulturmedium und enthielt Caseinhydrolysat, Vitamine und eine relativ hohe Salzkonzentration (Neumann 1995), jedoch keine pflanzenverwertbare Kohlenhydratquelle. Anstelle dieses Komplexmediums wurde ein vereinfachtes Basalmedium getestet (in mM: 5,0 CaCl₂, 1,0 K₂SO₄, 1,0 MgSO₄, 10 mM MES, pH 5,6 mit KOH; Isolation: 5 h nicht-schüttelnder Verdau bei 28°C; ES 700 mOsM) und in Suspensionsmedien Sorbitol-Mannitol durch Saccharose ersetzt. Diese Veränderungen resultierten in der Freisetzung einer sehr viel größeren Menge sphärischer infizierter Protoplasten als in bisherigen Isolationen (Abschätzung). Dem vereinfachten Basalmedium wurde in späteren Isolationen Ascorbinsäure zum Schutz vor Membranperoxidation zugesetzt. Es enthielt nun (in mM) 5,0 CaCl₂, 1,0 MgSO₄, 2,0 Ascorbinsäure, 10 MES und 5,0 KOH, was einen pH von 5,6 ergab.

Zur weiteren Verbesserung des Verdaus wurde eine Testisolation mit diesen modifizierten Medien unter Zusatz von Pectolyase Y-23 (1 mg mL⁻¹) zur ES durchgeführt. Die Mazeration des Gewebes wurde durch Pectolyase wesentlich verbessert, was zum fast kompletten Gewebeerfall bei der Protoplastenfreisetzung in leicht hypotonisches Medium führte. Zur Absättigung freigesetzter Proteasen wurde der ES bovines Serumalbumin (5 mg mL⁻¹) zugesetzt. Zuletzt wurde Cellulase Onozuka-R 10 gegen Onozuka-RS ausgetauscht, da diese eine höhere Reinheit besitzt (Herstellerangaben). Vakuuminfiltration des Enzymmediums wurde getestet, verbesserte

die Ausbeute aber nicht (Abb. IV.6). Durchschnittlich wurden pro Knöllchen ca. 5000 infizierte und 1000 nicht-infizierte Protoplasten isoliert (Zählungen mit Fuchs-Rosenthal-Kammer).

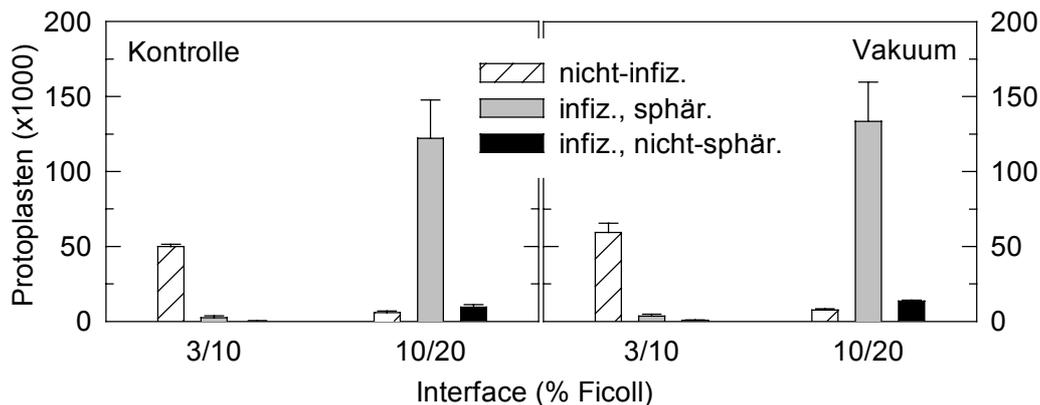


Abb. IV.6. Effekt der Vakuuminfiltration des Enzymmediums (15 min) auf die Ausbeute nicht-infizierter und infizierter Protoplasten. Isolation aus 20 Knöllchen pro Behandlung. Protoplasten wurden über einen Ficoll-Gradienten getrennt (4.2.3.3). In den Interfacefraktionen 3/10% Ficoll sind ca. 95% der Protoplasten nicht-infiziert sphärisch, in den Fraktionen 10/20% Ficoll sind ca. 90% infiziert sphärisch. Es gibt keinen Effekt der Vakuuminfiltration. Einzelexperiment; Werte aus vier Zählungen (Fuchs-Rosenthal Kammer) pro Interface.

4.3.2.7 Stabilisierung der infizierten Protoplasten

Ein Problem der osmotischen Protoplasten-Freisetzungsmethode bestand in der mechanischen Empfindlichkeit der expandierten, in leicht hypotonisches Medium entlassenen Protoplasten. Dem wurde durch Protoplastenfreisetzung in einen osmotischen Gradienten begegnet. Dabei wurde das Netz mit verdautem Gewebe in die obere, hypotonische Phase (260 mOsM) des Gradienten gebracht. Die freigesetzten Protoplasten gelangten durch Schwerkraft in die untere, isotonische Phase (410 mOsM), wodurch ihre Expansion verringert wurde.

4.3.3 Einfluss des physiologischen Gewebealters auf Isolation und Struktur infizierter Protoplasten

Da im indeterminierten Leguminosenknöllchen alle Entwicklungsstadien der infizierten Zelle nebeneinander vorliegen, wurde der Einfluss des physiologischen Alters auf die Protoplastierung durch getrennte Inkubation der apikalen (jungen) und basalen (alten) infizierten Zone getestet (Isolationsbedingungen wie in 4.3.2.4). Infizierte Protoplasten verschiedenen Alters unterschieden sich optisch deutlich voneinander: Solche aus der apikalen infizierten Zone waren mittelbraun und mit großer Zentralvakuole, während Protoplasten aus der Knöllchenbasis von schwarz-brauner Farbe waren und eine stark verkleinerte Vakuole besaßen (Abb. IV.8 D). Es zeigte sich, dass der Verdau bei älterem Gewebe besser war (ca. $0,6 \mu\text{L PCV mg}^{-1} \text{ FM}$) als bei jungem (ca. $0,2 \mu\text{L PCV mg}^{-1} \text{ FM}$). Zellzählungen (4.2.4) ergaben einen Anteil kugelförmiger Protoplasten an der Gesamtfraktion von 36-57% bei basalem Gewebe bzw. 49-70% bei apikalem Gewebe.

4.3.4 Vitalitätstests und Stärkenachweis

Die Integrität der Plasmamembran isolierter Protoplasten wurde mit mehreren, auf unterschiedlichen Mechanismen beruhenden Farbstoffen beurteilt.

4.3.4.1 Rhodamin-123

Die Eigenschaft von Rhodamin-123, lebende Mitochondrien anzufärben, kann zur Beurteilung der Vitalität von Zellen herangezogen werden (Wu 1987). In infizierten Protoplasten färbte es neben Mitochondrien auch Bacteroidmembrane (nicht gezeigt) und zeigte damit, dass Bacteroide eine Membran-

spannung besaßen. Eine Aussage über den Zustand der infizierten Wirtszelle war jedoch nicht möglich, da etwaige Mitochondrienmarkierung überstrahlt wurde.

4.3.4.2 Fluorescein-Diacetat

Der Fluorescein-Diacetat (FDA)-Test beruht auf der Spaltung des membrandurchlässigen FDA durch intrazelluläre Esterasen in Acetat und membranimpermeables Fluorescein, das in der Zelle akkumuliert. In verschiedenen Isolationen fluoreszierten sowohl nicht-sphärische, als auch sphärische infizierte Protoplasten nach FDA-Zugabe (Abb. IV.8 A, B). Letztere behielten ihre Fluoreszenz in etwas abgeschwächter Form auch nach dem Platzen bei (Abb. IV.8 A, B). Die Intensität der FDA-Fluoreszenz nahm mit dem physiologischen Alter der Protoplasten ab (Abb. IV.8 C). Auch aus infizierten Protoplasten freigesetzte Bacteroide zeigten FDA-Fluoreszenz (Abb. IV.8 D). Es gab verschiedene Versuche, Bacteroide in Protoplasten selektiv abzutöten, um deren FDA-Fluoreszenz zu unterdrücken. Zusatz der Antibiotika Cefotaxim (500 mg L^{-1}) oder Chloramphenicol (100 mg L^{-1}) zu Protoplasten- und Enzymmedien zeigte keine Wirkung. Auch Polymyxin B (50 mg L^{-1}), ein Inhibitor von Funktionen der Zellmembran gramnegativer Bakterien, beeinträchtigte die FDA-Fluoreszenz in Bacteroiden nicht. Thimerosal (1 g L^{-1}) eliminierte die FDA-Fluoreszenz von Bacteroiden und Cytosol, wirkte also phytotoxisch.

4.3.4.3 Propidiumjodid

Dieser DNA/RNA-Farbstoff ist membranimpermeabel, führt zu einer intensiven Fluoreszenz der Kerne von Zellen mit defekter Plasmamembran und wird aus diesem Grund zur Färbung toter Zellen verwendet (Stein und Hansen

1999). In Propidiumjodid (PI)-Tests färbten immer über 90% der sphärischen Protoplasten negativ, während nicht-sphärische den Farbstoff akkumulierten (Abb. IV.8 E). PI-Färbetests (4.2.5) wurden im Laufe der Methodenentwicklung mehrfach angewendet (Abb. IV.7).

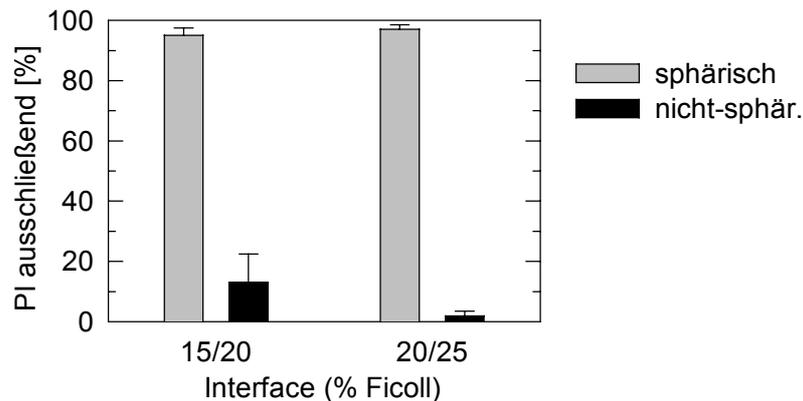


Abb. IV.7. Ergebnis eines Propidiumjodid (PI)-Vitalitätstests. Der PI-Ausschluss sphärischer und nicht-sphärischer infizierter Protoplasten aus zwei Interface-Fractionen eines Ficoll-Separationsgradienten wurde mit einer Fuchs-Rosenthal-Kammer ausgezählt (n=8). Über 90% der sphärischen Protoplasten schlossen PI aus.

4.3.4.4 Neutralrot

Dieser acidotrope Farbstoff akkumuliert in Vakuolen mit niedrigem pH-Wert und intakter Membran. Dementsprechend konnte eine Rotfärbung der Vakuolen sphärischer nicht-infizierter Protoplasten beobachtet werden (Abb. IV.8 F), die mit der Zeit zunahm. Es wurden außerdem fädige Strukturen in Vakuolen nicht-infizierter Zellen angefärbt (Abb. IV.8 G). Sphärische infizierte Zellen zeigten jedoch ausnahmslos keine Neutralrotakkumulation in Vakuolen (Abb. IV.8 H). Nach einigen Minuten färbten die Kerne meist nicht-sphärischer Protoplasten rot (Abb. IV.8 I).

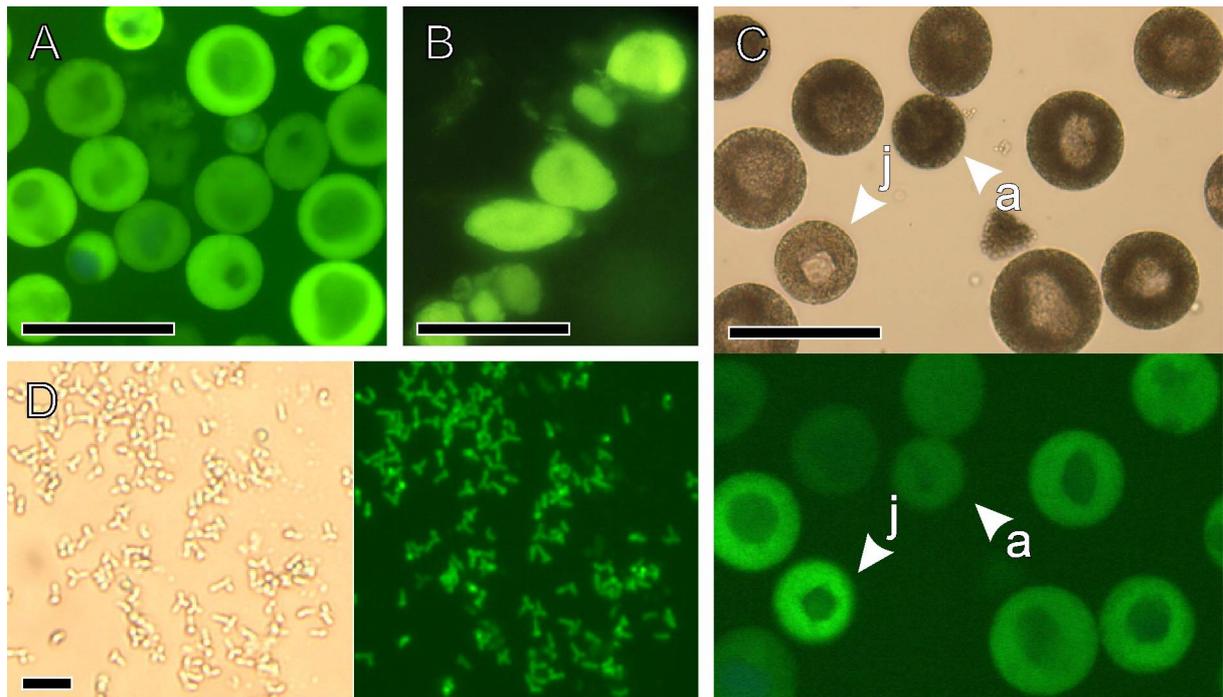


Abb. IV.8. A-D. FDA-Vitalitätstests mit infizierten Protoplasten. **A.** FDA-Färbung einer Suspension nach neuem Protokoll (4.2.3) isolierter, sphärischer infizierter Protoplasten. UV-Fluoreszenz. Balken: 100 μm . **B.** FDA-Färbung einer Suspension nach einem konventionellen Protokoll (4.2.2) isolierter, nicht-sphärischer infizierter „Protoplasten“. UV-Fluoreszenz. Balken: 100 μm . **C.** Heterogene Suspension physiologisch junger (j) und alter (a) FDA-gefärbter infizierter Protoplasten. oben: Hellfeld; unten: UV-Fluoreszenz. Balken: 100 μm . **D.** Aus nicht-sphärischen Protoplasten isolierte, FDA-gefärbte Bacteroide. links: Hellfeld; rechts: UV-Fluoreszenz. Balken: 10 μm .

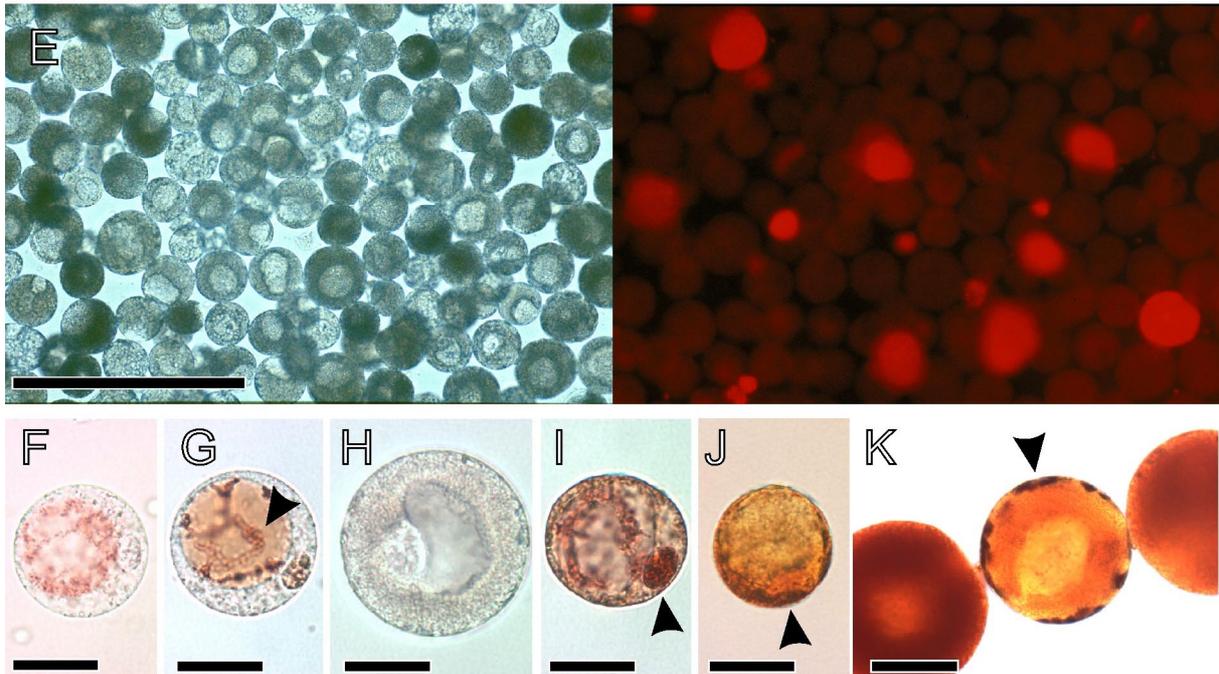


Abb. IV.8 (Fortsetzung). E. Suspension sphärischer infizierter Protoplasten nach Propidiumiodid-Färbung. Nur geborstene Protoplasten akkumulieren den Farbstoff. links: Hellfeld; rechts: Fluoreszenz mit Hintergrundbeleuchtung. Balken: 250 μm . F-I. Neutralrot-Färbungen infizierter und nicht-infizierter Protoplasten, Hellfeld. Balken: 25 μm . F. Nicht-infizierte Protoplasten akkumulieren Neutralrot in der Zentralvakuole. G. Bei längerer Färbedauer werden Strukturen in der Vakuole sichtbar (Pfeilspitze). H. In infizierten Zellen findet keine Neutralrot-Akkumulation statt. I. Neutralrot-Färbung eines Zellkerns (Pfeilspitze). J-K. Stärkenachweis mit Lugolscher Lösung, Hellfeld. Balken: 25 μm . J. Nicht-infizierte Protoplasten besitzen Stärke in der Peripherie (Pfeilspitze). K. Stärke ist auch nachweisbar in physiologisch jungen (Mitte, Pfeilspitze), jedoch nicht in physiologisch alten infizierten Protoplasten (links, rechts).

4.3.4.5 Lugolsche Lösung

Zellen der infizierten Zone von Leguminosenknöllchen sind in der Lage, Stärke in Amyloplasten zu speichern. Durch Färbung mit Lugolscher Lösung wurde untersucht, ob infizierte und nicht-infizierte Protoplasten dieser Zellen nach der Isolation noch Stärke enthalten und ob dabei das physiologische Alter eventuell eine Rolle spielt. Es wurden parallele Protoplastenisolationen mit

Betain und Saccharose als Osmotikum durchgeführt (Methode lt. 4.2.3). Nicht-infizierte und physiologisch junge infizierte Protoplasten (4.3.3) besaßen Stärke, wobei es keine Rolle spielte, ob sie in Betain- oder Saccharosemedium isoliert wurden (Abb. IV.8 J, K). Im Gegensatz dazu enthielten physiologisch alte infizierte Protoplasten (4.3.3) keine Stärke (Abb. IV.8 K).

4.3.5 Separation verschiedener Protoplastentypen

Die Separation sphärischer und deformierter, sowie infizierter und nicht-infizierter Protoplasten aus dem Zentralgewebe von *V. faba*-Knöllchen wurde zunächst aufgrund unterschiedlicher Sinkgeschwindigkeiten in einem kontinuierlichen Ficollgradienten (0 - 100 g L⁻¹), basierend auf Suspensionsmedium nach 4.3.2.6, angestrebt (rate-zonal separation, Sharpe 1988). Obwohl deformierte und schwach vakuolisierte infizierte Protoplasten unter Schwerkraft schneller sedimentierten als physiologisch junge (4.3.3), war die Trennschärfe unzureichend. Alternativ wurde eine Trennung mittels isopyknischer Dichtegradientenzentrifugation (Sharpe 1988) getestet. Dabei wurden osmotische Freisetzung und Separation der Protoplasten kombiniert, indem ein isotonischer gestufter Dichtegradient (0/5/10/15/20/25% Ficoll) mit hypotonischem Medium überschichtet wurde, in das die auf dem Inkubationsnetz befindlichen verdauten Gewebstücke gebracht wurden (Abb. IV.2 G). Nach Zentrifugation (30 min, 15 *g*) sammelten sich nicht-infizierte Zellen über der 10%-Stufe, während infizierte diese passierten und sich auf mehrere Banden verteilten. Dabei befanden sich junge, stark vakuolisierte infizierte Protoplasten (4.3.3) weiter oben (10/15% Phasengrenze), während ältere eine höhere Dichte aufwiesen und in dichteres Medium wanderten (15/20% Phasengrenze und darunter). Im Pellet befanden sich ausschließlich nichtvakuolisierte sphärische und deformierte Protoplasten. Freigesetzte Bacteroide verblieben über der 10% Stufe. Bei längerer Zentrifugation

passierte eine größere Anzahl infizierter Protoplasten die 10/15% Phasengrenze.

Mit einem vereinfachten Gradienten (1/10/20/27% Ficoll) konnten erstmals nicht-infizierte (1/10% Phasengrenze) und infizierte (10/20% Phasengrenze) Protoplasten in größerer Zahl separiert werden (Abb. IV.2 J; Abb. IV.9), eine Voraussetzung für die geplanten ^{14}C -Aufnahmestudien. Zur Vermeidung der Kontamination der Fraktion nicht-infizierter Protoplasten mit freigesetzten Bacteroiden enthielt die obere Phase 1% Ficoll, was die Bacteroidsedimentation verlangsamte.

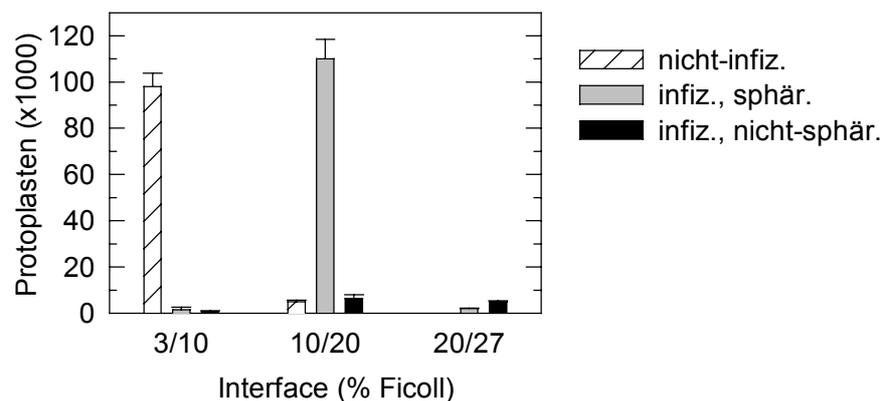


Abb. IV.9. Typische Trennung nicht-infizierter und infizierter Protoplasten in einem Ficoll-Stufengradienten. Isolation aus 20 Knöllchen. In der Fraktion 3/10% Ficoll sind 98% der Protoplasten nicht-infiziert sphärisch, in der Fraktion 10/20% Ficoll sind 91% infiziert sphärisch. Werte aus acht Zählungen (Fuchs-Rosenthal-Kammer) pro Phasengrenze.

Zur Durchführung von Aufnahmestudien mit ^{14}C -Zuckern war die bei Testisolationen (4.3.2.6) verwendete hohe Saccharosekonzentration im ES unerwünscht. Alle Medien enthielten daher zukünftig Betain (MW: 117) als Osmotikum. Dies hatte für Aufnahmeexperimente (5.2.5) außerdem den Vorteil, dass die Dichte der Medien geringer war als bei den Osmotika

Saccharose (MW: 342) oder Mannitol (MW: 182). Die Dichtestufen des Separationsgradienten mussten angepasst werden (1,25/12,75/20,00% Ficoll). Propidiumiodid-Vitalitätstests zeigten, dass >90% der im Betain-System isolierten und separierten sphärischen Protoplasten eine intakte Plasmamembran besaßen (Abb. IV.10).

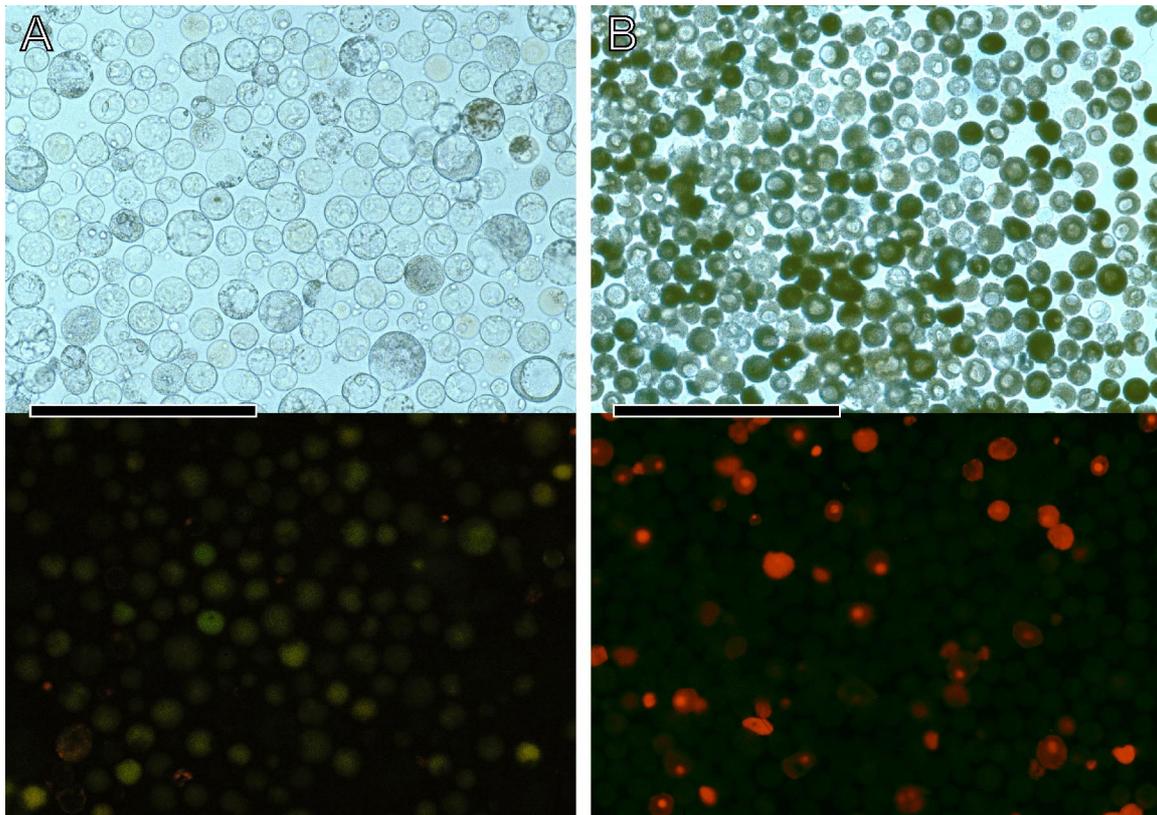


Abb. IV.10. Für ^{14}C -Aufnahmestudien verwendete nicht-infizierte und infizierte Protoplasten aus *V. faba*-Knöllchen nach Propidiumjodidfärbung. Oben: Hellfeld; unten: Fluoreszenz. **A.** Nicht-infizierte Fraktion aus der 1,25/12,75% Ficoll-Phasengrenze des Separationsgradienten. Nicht-infizierte Zellen zeigen grüne Autofluoreszenz. Balken: 250 μm . **B.** Infizierte Fraktion aus der 12,75/20,00% Ficoll-Phasengrenze. Balken: 500 μm .

4.3.6 Adhäsion und Agglutination von Protoplasten

Beim Abnehmen der Interfacefraktionen des Gradienten stellte sich heraus, dass eine große Anzahl Protoplasten an der Oberfläche der Glas-Zentrifugenröhrchen anhafteten. Dies konnte durch Beschichtung der Glasoberfläche mit Dimethylsilan nicht verhindert werden. Die Verwendung von Kunststoffröhrchen beseitigte das Problem größtenteils. Zukünftig wurden für sämtliche Isolations- und Separationsschritte Röhren aus Polystyrol (PS) oder Polycarbonat (PC) verwendet.

Bei höherer Zelldichte im Gradienten-Interface agglutinierten außerdem sowohl nicht-infizierte, als auch infizierte Protoplasten bei der Gradientenzentrifugation. Die Zusammenballungen waren durch Waschen oder Pipettieren nicht lösbar und waren wahrscheinlich das Resultat eines Kolloideffektes mit Ca^{2+} als Brücke. Es wurde eine Isolation mit 0,5 statt 5 mM Ca^{2+} im Basalmedium (BM, 4.3.2.6) getestet. Dies verhinderte die Verklumpung vollständig. Sehr viele Protoplasten zeigten jedoch Plasmamembran-Ausstülpungen, und die Ausbeute sphärischer infizierter Protoplasten war reduziert (Abb. IV.11).

In Folgeexperimenten wurden daher 5 mM Ca^{2+} beim Verdau beibehalten, während Protoplastenfreisetzung und -separation in Medium mit 0,5 mM Ca^{2+} erfolgten. Nach dieser Methode isolierte u. separierte sphärische Protoplasten besaßen zu >90% eine intakte Plasmamembran (Propidiumjodidfärbung).

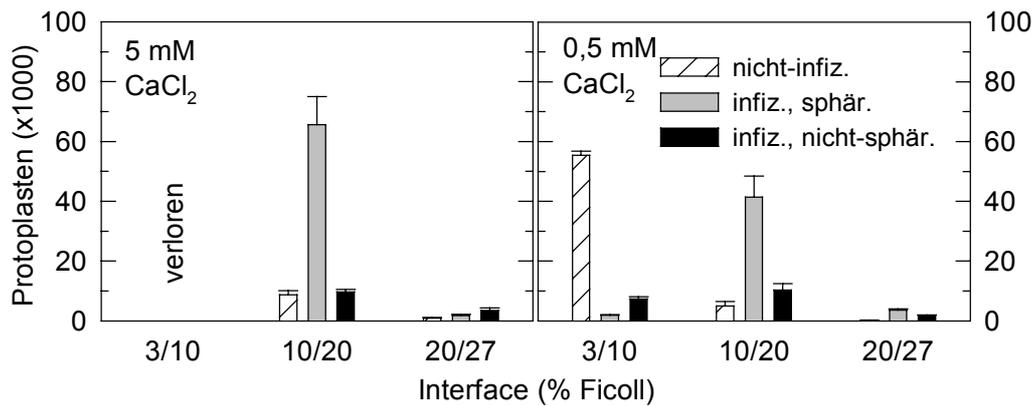


Abb. IV.11. Effekt reduzierter CaCl_2 -Konzentration in allen Medien auf die Gesamtausbeute an Protoplasten. Isolation aus 20 Knöllchen pro Behandlung. Interface (3/10% Ficoll) ging bei Abnahme verloren. Bei 0,5 mM Ca^{2+} ist die Anzahl sphärischer infizierter Protoplasten vermindert. Werte aus vier Zählungen (Fuchs-Rosenthal-Kammer) pro Interface.

4.3.7 Ultrastruktur infizierter *V. faba*-Protoplasten

In früheren Arbeiten isolierte infizierte Zentralgewebeprotoplasten waren sämtlich nicht-sphärisch, wurden jedoch als intakt dargestellt (4.4). Da dies den Ergebnissen dieser Arbeit widersprach, wurde die Ultrastruktur sphärischer und deformierter infizierter Protoplasten mittels TEM näher untersucht (4.2.6). Physiologisch alte und junge infizierte Protoplasten (4.3.3) unterschieden sich deutlich voneinander. Solche in früheren Entwicklungsstadien besaßen ein elektronendicht-kontrastierendes Cytosol (Abb. IV.12 A). Symbiosome waren gleichmäßig im zentralen Cytosol verteilt und enthielten stets nur ein Bacteroid. In den Bacteroiden waren helle kreisrunde Flecken verschiedener Größe erkennbar. Dabei handelte es sich vermutlich um Polyhydroxybutyrat. Mitochondrien bildeten Cluster in der Peripherie des Cytosols (Abb. IV.12 B). Diesen benachbart, entlang der Plasmamembran, lagen Amyloplasten mit großen Stärkekörnern (Abb. IV.12 C). Des weiteren

waren Liposomen, Microbodies, rauhes ER, und Dictyosome erkennbar (nicht gezeigt). Der Zellkern lag stets am Tonoplasten (nicht gezeigt). Die Vakuole enthielt neben griesigem Präzipitat von Doppelmembranen begrenzte Strukturen (Abb. IV.12 D). Bei der Strukturuntersuchung wurde besonderes Augenmerk auf das Verhalten der Protoplasten nach einer zufälligen Beschädigung bei der Isolation gerichtet. Eine mechanische Beschädigung (Abb. IV.12 E) führte trotz fehlender Plasmamembran (Abb. IV.12 F) nicht zum Zerfließen des Cytosols. In hypotonem Medium expandierten nahe der Plasmamembran gelegene Symbiosome (Abb. IV.12 G) und perforierten diese (Abb. IV.12 H).

Physiologisch ältere Protoplasten enthielten weniger oder fast kein elektronendichtes Cytosol (Abb. IV.12 I). Stattdessen erschienen Teile von Peribacteroid- und Plasmamembranen wahrscheinlich seneszenten Protoplasten granulär (Abb. IV.12 J, K). Auch physiologisch alte Protoplasten zerfielen nicht, wenn sich die beschädigte Plasma- oder Vakuolenmembran ablöste (Abb. IV.12 L).

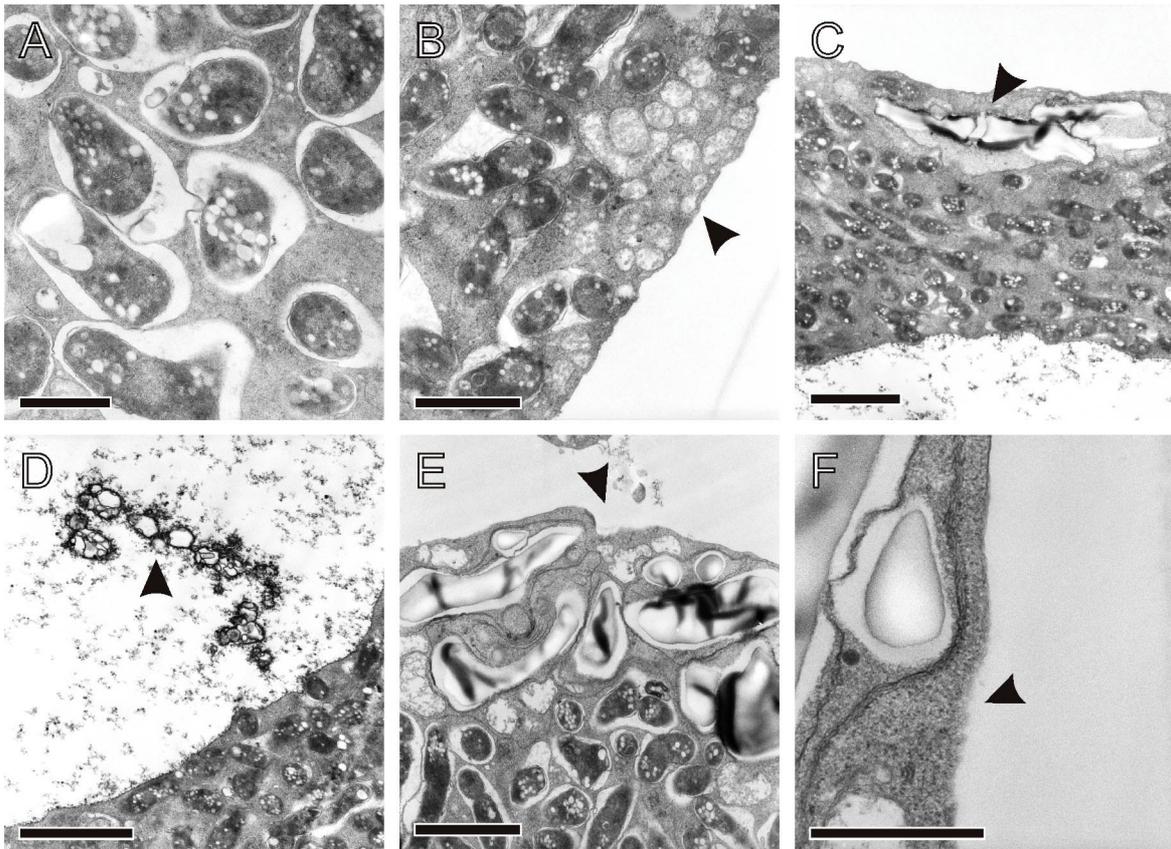


Abb. IV.12. TEM-Aufnahmen mit Uranylacetat und Bleicitrat kontrastierter, infizierter *V. faba*-Protoplasten. **A.** In physiologisch jungen Protoplasten sind Symbiosome mit eingeschlossenen Bacteroiden in einem stark kontrastierendem Cytosol eingebettet. Balken: 1 μm **B.** Mitochondrien (Pfeilspitze) treten in plasmamembrannahen Clustern auf. Balken: 2 μm . **C.** Amyloplasten (Pfeilspitze) liegen nahe Mitochondrienclustern in der Peripherie des Protoplasten. Balken: 3 μm . **D.** Der fixierte Vakuoleninhalt besitzt eine griesige Struktur. In der Vakuole treten tubuläre membranartige Strukturen auf (Pfeilspitze). Balken: 3 μm . **E.** Mechanisch beschädigter physiologisch junger Protoplast. Das Cytosol mit eingeschlossenen Organellen (Amyloplasten, Mitochondrien, Bacteroide) zerfällt nicht bei lokaler Beschädigung (Pfeilspitze). Balken: 2 μm . **F.** Vergrößerung aus E. Das Cytosol ist teilweise nicht von einer Plasmamembran umgeben, erkennbar an der rauhen Oberfläche (Pfeilspitze). Balken: 1 μm .

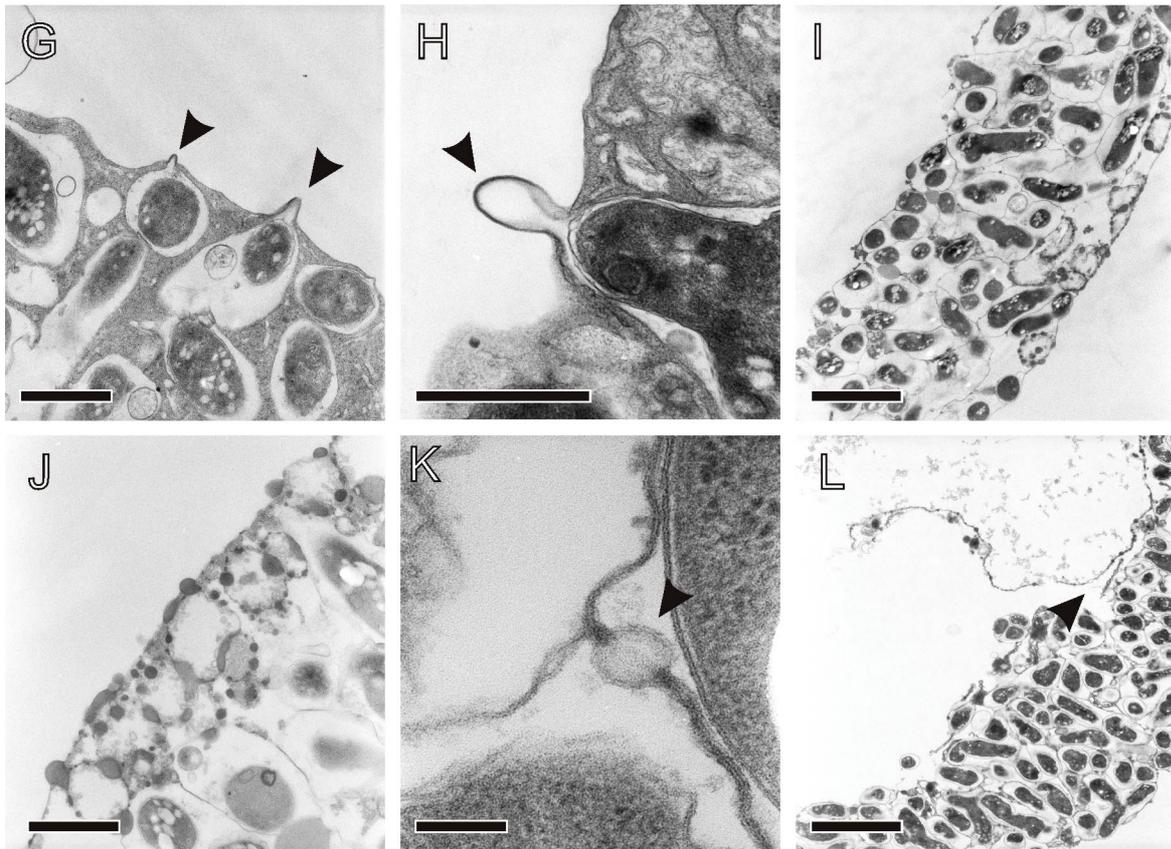


Abb. IV.12 (Fortsetzung). **G.** Beim Platzen physiologisch junger Protoplasten in hypotoner Lösung stülpt sich die Peribacteroidmembran peripher liegender Symbiosome durch die Plasmamembran und perforiert diese (Pfeilspitze). Balken: 1 μm . **H.** Fortgeschrittenes Stadium ausgestülpter Peribacteroid- und Plasmamembran. Balken: 1 μm . **I.** Bei physiologisch alten infizierten Protoplasten liegt zwischen Symbiosomen und anderen Organellen fast kein Cytosol mehr vor. Balken: 3 μm . **J.** Plasma- und Peribacteroidmembranen degradierender physiologisch alter Protoplasten weisen expandierte Stellen auf. Balken: 1 μm . **K.** Vergrößerung einer expandierten Stelle in der Peribacteroidmembran. Balken: 100 nm. **L.** Bei Beschädigung der Tonoplastenmembran physiologisch alter Protoplasten bleiben auch deren Zellbestandteile zusammenhängend. Balken: 3 μm .

4.3.8 Isolation von Protoplasten aus dem Zentralgewebe von *Glycine max*-Knöllchen

In der Vergangenheit wurde oftmals versucht, infizierte Protoplasten aus determinierten Knöllchen zu isolieren, was jedoch immer zu nicht-sphärischen Strukturen führte. Daher wurde die Anwendbarkeit der in dieser Arbeit für indeterminierte *V. faba*-Knöllchen entwickelten Isolationsmethode auf Knöllchen von *G. max* untersucht. Eine direkte Übertragbarkeit der Methode war nicht gegeben. Nach dem Verdau enthielt die Enzymsuspension große Mengen an Bacteroiden und zerbrochenen Zellen. Ins niedrigosmolale FreisetzungsmEDIUM (SM 2a) wurden nur sehr wenige Protoplasten, jedoch sehr viele Zellbruchstücke freigesetzt. Daher waren die Osmolalitäten der Medien (Tab. IV.1) für *G. max* zu niedrig, was zum Platzen der meisten Zellen führte. Die verbleibenden freigesetzten infizierten Protoplasten waren sämtlich nichtvakuolisiert. Sie waren von sphärischer oder unregelmäßiger Form (Abb. IV.13 A, B). Propidiumiodidfärbungen zeigten, dass nur sphärische Protoplasten den Farbstoff ausschlossen, während nicht-sphärische lokale Undichtigkeiten in der Membran besaßen, die zu Beginn der Färbung lokalisiert werden konnten (Abb. IV.13 C).



Abb. IV.13. Infizierte Protoplasten aus dem Zentralgewebe von *G. max*-Knöllchen. **A.** Kugelförmiger, nichtvakuolierter Protoplast. **B.** Nicht-sphärischer Protoplast. **C.** Eindringen von Propidiumiodid in nicht-sphärischen Protoplasten. Fluoreszenz mit Hintergrundbeleuchtung. Balken: 100 μm .

4.4 Diskussion

4.4.1 Ansätze zur Isolation infizierter Protoplasten aus dem Knöllchen-Zentralgewebe

Seit dem ersten Bericht von Davey et al. (1973) über die erfolgreiche Isolation infizierter Protoplasten aus dem Zentralgewebe von *Glycine max*-Knöllchen wurden infizierte Protoplasten mit verschiedenen Ein- und Zweischrittmethoden (4.2.2) aus Knöllchen unterschiedlicher Arten und zu verschiedensten Zwecken isoliert. Zunächst wurde versucht, die Fähigkeit zur N₂-Fixierung dieser Zellen zu erhalten, was mit Isolaten aus *Vigna unguiculata* (Broughton et al. 1976, Wooi und Broughton 1979) und *G. max* (Schetter und Hess 1977, Olsson und Gresshoff 1984) auch scheinbar gelang. Die Nitrogenaseaktivität dieser Fraktionen betrug jedoch nur noch 0,03% der von Knöllchen an der intakten Pflanze (Olsson und Gresshoff 1984) oder setzte oft erst nach einer ein- bis zweitägigen Lagphase ein (Broughton et al. 1976). Diese Nitrogenaseaktivität könnte jedoch auch auf die Aktivität intakter Bacteroide in defekten Zellen zurückzuführen sein (Galun 1981). Mit infizierten Protoplasten aus dem Zentralgewebe determinierter Knöllchen wurden ferner Enzymaktivitäten des C- und N-Stoffwechsels von *G. max* (Streeter 1982, Hanks et al. 1983, Shelp et al. 1983, Kouchi et al. 1988), der alternativen Oxidase von *G. max* (Kearns et al. 1992) und Proteaseaktivitäten von *Phaseolus vulgaris* (Pladys et al. 1991) untersucht.

Alle in diesen Arbeiten beschriebenen infizierten Protoplasten, sowie auch solche aus *Vigna sinensis* und *Centrosema pubescens* (Hoh und Broughton 1975), besaßen trotz Zellwandfreiheit eine unregelmäßige, nicht-sphärische Form, wie es auch bei ersten Isolationen in vorliegender Arbeit der Fall war (4.3.1). Diese Eigenschaft wurde durch die Bacteroidfüllung der nicht-vakuolisierten Zellen erklärt, die eine Formänderung nicht erlauben sollte

(Davey et al. 1973, Syono et al. 1979). Teilweise wurde außerdem bemerkt, dass diese Protoplasten in hypotonischem Medium nicht platzen (Shelp et al. 1983). Es sind keine anderen Zelltypen bekannt, die trotz intakter Plasmamembran nicht osmotisch aktiv sind.

Im Gegensatz zu der Vielzahl an Arbeiten mit Protoplasten aus determinierten Knöllchen wurden indeterminierte Knöllchen wenig bearbeitet. In diesen liegen unterschiedliche Entwicklungsstadien der infizierten Zelle nebeneinander vor (1.2). Aus Knöllchen von *Pisum sativum* (Syono et al. 1979) und *V. faba* (Davey et al. 1980) ließen sich einige sphärische infizierte Protoplasten aus der Invasionszone isolieren, während solche aus fortgeschrittenen Infektionsstadien nicht-sphärisch waren und eine glatte oder rauhe Oberfläche besaßen (Syono et al. 1979), was mit der Hypothese übereinstimmen würde, dass bacteroidgefüllte Protoplasten keine sphärische Form annehmen können. In diesen Arbeiten waren jedoch nur sphärische Protoplasten in sehr frühen Infektionsstadien mit artfremden Mesophyllprotoplasten fusionierbar (Syono et al. 1979, Kajita et al. 1980), was die Membranintaktheit nicht-sphärischer Protoplasten in Frage stellt.

4.4.2 Eine neue Methode zur Isolation und Separation von Protoplasten aus dem Knöllchen-Zentralgewebe

Eine Isolation sphärischer Protoplasten aus infizierten Zellen in fortgeschrittenen, N₂-fixierenden Stadien wurde bisher weder bei determinierten, noch bei indetermierten Knöllchen erreicht. Fehlende osmotische Aktivität und Nichtfusionierbarkeit nicht-sphärischer Protoplasten deuteten jedoch an, dass die Plasmamembranen dieser Protoplasten nicht intakt waren. Aufgrund dieser Annahmen wurde das Isolationsprotokoll schrittweise modifiziert (4.3.2), was schließlich in einer neuen Methode und in der Freisetzung sphärischer,

osmotisch aktiver Protoplasten aus dem infizierten Zentralgewebe von *V. faba*-Knöllchen resultierte (4.2.3, Abb. IV.2). Variation der Mediumosmolalitäten zeigte dabei, dass infizierte und nicht-infizierte Zellen aus *V. faba*-Knöllchen relativ niedrige Konzentrationen osmotisch wirksamer Stoffe enthielten (4.3.2.2). Dies war wahrscheinlich nicht methodenbedingt, da an *V. faba* angepasste Mediumosmolalitäten für die Isolation von *G. max*-Protoplasten zu niedrig waren (4.3.8). In früheren Arbeiten wurden wesentlich höhere Osmolalitäten zur Isolation infizierter Protoplasten verwendet. Es ist daher nicht völlig auszuschließen, dass nicht-sphärische Protoplasten in diesen Arbeiten plasmolysiert waren. Trotz unangepasster Osmolalitäten war es mit der neuen Isolationsmethode möglich, nichtvakuolisierte sphärische infizierte Protoplasten aus determinierten *G. max*-Knöllchen zu isolieren (4.3.8). Damit ist die Hypothese, dass die hohe Bacteroiddichte eine Formänderung der infizierten Zelle verhindert (Davey et al. 1973), widerlegt.

Ein Hauptproblem der ursprünglichen Isolationsmethode stellte die Freisetzung pflanzlicher Phenolverbindungen (Tannine) durch Cortezellen in die Enzymsuspension dar (Abb. IV.4). Tannine präzipitieren Proteine und oxidieren zu Chinonen, die stark oxidierend wirken und mit Protein kovalente Bindungen eingehen (Loomis und Battaile 1966). Spuren von Tanninen hemmen daher die Aktivität isolierter Enzyme (Loomis und Battaile 1966). Bei Protoplastenisolationen aus *V. faba*-Gewebe führte Tanninfreisetzung zum Zelltod (Tegeder et al. 1995). Bei der Isolation infizierter Protoplasten scheint das Problem relativ spezifisch für *V. faba* zu sein, da es in früheren Arbeiten mit anderen Arten nicht erwähnt wurde. Dem Problem wurde durch manuelle Entfernung der Phenolquelle, d.h. des Knöllchencortex, vor dem Verdau begegnet (Abb. IV.2).

Auch aus präpariertem Zentralgewebe konnten mit herkömmlichen Methoden keine sphärischen infizierten Protoplasten isoliert werden. Diese wurden erst

freigesetzt, nachdem das verdaute Gewebe leicht hypotonen Bedingungen ausgesetzt wurde (4.3.2.2). Damit beruht das Prinzip der neuen Isolationsmethode auf osmotischer Expansion der Protoplasten im intakten Gewebeverband. Dies ist möglich, da Pflanzenprotoplasten eine relativ starke Oberflächenvergrößerung durch Einbau von Membranmaterial tolerieren (Wolfe et al. 1986). Ähnliche Methoden der Protoplastengewinnung wurden bei Blattmesophyllgeweben verschiedener Arten bereits erfolgreich angewendet (Elzenga et al. 1991). Oft waren Patch-Clamp-Experimente erst mit osmotisch freigesetzten Protoplasten möglich, was auf einen hohen Grad der Membranintaktheit bei dieser Methode schließen lässt (Vogelzang und Prins 1992).

Bei sehr starker Plasmolyse der Zellen durch hohe Osmolalitäten der Enzymsuspension wurden weniger sphärische infizierte Protoplasten freigesetzt als bei mildereren Bedingungen (4.3.2.5). Es ist bekannt, dass starke Plasmolyse die Vitalität reduziert, wobei der größte Vitalitätsverlust beim Übergang vom plasmolysierten zum deplasmolysierten Zustand auftritt (Wu und Cahoon 1995). Dies entspricht der Beobachtung, dass schnelle osmotische Expansion von Protoplasten zu höherer Membranspannung und häufigerer Lyse führt (Wolfe et al. 1986). Osmotisch freigesetzte Mesophyllprotoplasten verschiedener Arten wiesen jedoch trotz starkem osmotischem Schock (Absenkung von 610 auf 210 mOsM) eine Vitalität von >90% auf (Elzenga et al. 1991). Bei der in vorliegender Arbeit entwickelten Isolationsmethode wurde das Gewebe geringeren osmotischen Gradienten ausgesetzt (Absenkung von 550 auf 260 mOsM). Die Protoplasten expandierten relativ langsam, so dass noch nach einer Stunde Freisetzungsdauer viele Protoplasten das Gewebe verließen (Abb. IV.2). Unmittelbar nach der Freisetzung gelangten die Protoplasten durch Schwerkraft wieder in isotones Medium (4.3.2.7), so dass ihre Expansion reduziert wurde. Die Membranintaktheit dieser Zellen äußerte sich in osmotischer Aktivität (Abb.

IV.5) und dem Ausschluss des Farbstoffs Propidiumjodid (Abb. IV.8). Sie nahm mit dem physiologischen Alter der Protoplasten ab (4.3.3), da der Anteil kugelförmiger Protoplasten an der infizierten Gesamtfraction bei apikalem Gewebe niedriger war als bei basalem Gewebe.

Zur Separation der isolierten Protoplasten wurde ein diskontinuierlicher Ficollgradient verwendet (4.3.5). Nach Anpassung von Dichtestufen und Ermittlung der minimal nötigen Zentrifugationsparameter erlaubte dieser eine effektive Trennung nicht-infizierter, infizierter und nicht-sphärischer Protoplasten (Abb. IV.2). Ähnliche Gradienten wurden bereits erfolgreich zur Reinigung von Wurzelprotoplasten aus *Zea mays* eingesetzt (Lin 1980).

4.4.3 Eignung verschiedener Vitalitätstests zur Feststellung der Intaktheit infizierter Protoplasten

Zur Ermittlung der Vitalität infizierter Protoplasten wurde zunächst der Fluorescein-Diacetat (FDA)-Test herangezogen. FDA diffundiert dabei durch die Plasmamembran und wird im Cytosol durch unspezifische Esterasen gespalten. In Zellen mit intakter Plasmamembran akkumuliert daher membranimpermeables Fluorescein, das fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen werden kann. Dieser FDA-Test wird seit langem routinemäßig zur Beurteilung von Membranintaktheit und Zellvitalität eingesetzt (Widholm 1972), insbesondere bei Protoplasten unterschiedlicher Arten und Gewebe (Getz et al. 1987, Elzenga et al. 1991, Fieuw und Willenbrink 1991, McDonald et al. 1996b). Aus diesem Grund wurde er in der Vergangenheit auch zur Abschätzung der Vitalität nicht-sphärischer infizierter Protoplasten verwendet (Davey et al. 1973, Li und Day 1991). Dieser Zelltyp besitzt jedoch die Besonderheit, dass er einen Mikrosymbionten beherbergt, der selbst zur FDA-Spaltung fähig ist. Daher fluoreszierten auch aus geborstenen infizierten

Protoplasten entwichene Bacteroide nach FDA-Zugabe (Abb. IV.8 D). Diese Bacteroidfluoreszenz überstrahlte vorhandene oder nicht vorhandene Fluoreszenz des sie umgebenden Wirtscytosols. Daher kann aus der Fluoreszenz nicht-sphärischer infizierter Protoplasten (Abb. IV.8 B), die sich nicht von der Fluoreszenz sphärischer Protoplasten (Abb. IV.8 A) unterschied, *nicht* auf deren Vitalität geschlossen werden. Versuche, Bacteroide in Protoplasten selektiv abzutöten, um etwaige Cytosolfluoreszenz sichtbar zu machen, schlugen fehl (4.3.4.2). Die FDA-induzierte Fluoreszenz nahm mit dem physiologischen Alter sphärischer infizierter Protoplasten ab (Abb. IV.8 C). Es ist unklar, ob dies auf den Rückgang der bakteriellen oder cytosolischen Esteraseaktivitäten zurückzuführen ist. Alles in allem eignet sich der FDA-Test nicht zur Beurteilung der Vitalität infizierter Protoplasten.

Da Vitalitätstests, deren Prinzip auf der Nutzung metabolischer Aktivität des Cytoplasmas beruht, bei infizierten Zellen nicht anwendbar sind, wurde mit Propidiumjodid ein Farbstoff getestet, der an Nukleinsäuren von Zellen bindet, deren Plasmamembran beschädigt ist (Stein und Hansen 1999). Da Bacteroide aus sphärischen und nicht-sphärischen infizierten Protoplasten FDA-Fluoreszenz zeigten (s.o.), also über eine intakte Membran verfügten, sollte die Färbung spezifisch Aufschluss über die Intaktheit der pflanzlichen Plasmamembran geben. In allen durchgeführten Propidiumjodid-Tests schlossen über 90% der sphärischen Protoplasten den Farbstoff aus, während nicht-sphärische ihn akkumulierten (Abb. IV.7), was auch für solche aus determinierten *G. max*-Knöllchen gilt (Abb. 4.13) Damit gab es eine gute Korrelation der Testergebnisse mit anderen Vitalitätsindikatoren, wie z.B. osmotischer Aktivität (Abb. IV.5).

Aufgrund dieser histologischen Tests wurde die Vermutung weiter erhärtet, dass die in bisherigen Arbeiten isolierten Fraktionen nicht-sphärischer infizierter Protoplasten keine intakte Plasmamembran besaßen.

4.4.4 Ultrastrukturelle Besonderheiten infizierter Protoplasten aus dem Knöllchen-Zentralgewebe

Zur strukturellen Charakterisierung infizierter Protoplasten wurden diese licht- und elektronenmikroskopisch untersucht (4.3.4; 4.3.7). Die räumliche Anordnung der Organellen blieb bei der Isolation erhalten. Wie in infizierten Zellen des Zentralgewebes intakter Knöllchen (Newcomb 1976, Bergersen 1997, Abd-Alla et al. 2000) lagen Amyloplasten in der Peripherie (Abb. IV.12 C) und waren mit Gruppen von Mitochondrien assoziiert (Abb. IV.12 B, E). Im intakten Knöllchen befanden sich diese Stellen wahrscheinlich an Interzellularen, da dort eine Mitochondrienschicht tieferliegende Symbiosome vor hoher O₂-Konzentration schützt (1.6).

4.4.4.1 Bildung nicht-sphärischer infizierter Protoplasten

Einige der elektronenmikroskopisch betrachteten infizierten Protoplasten wiesen keine sphärische Form auf. Bei diesen war z.T. eine mechanische Beschädigung erkennbar (Abb. IV.12 E). Interessanterweise führten solche Beschädigungen nicht zum Zerfall der Zelle; das Cytosol blieb ohne umhüllende Plasmamembran kohärent (Abb. IV.12 F) und schien daher eine gelartige Konsistenz zu besitzen. Die Plasmamembran haftete weiterhin an nicht beschädigten Teilen der Zelle. Die Symbiosome könnten außerdem, z.B. mittels Cytoskelett, verbunden sein, da auch defekte scheinbar cytosolfreie Protoplasten nicht zerfielen (Abb. IV.12 L). Auf kohärentes Cytosol oder verbundene Symbiosome infizierter Zellen deutet auch das gruppenweise Auftreten von Symbiosomen in Fusionskörpern aus sehr jungen infizierten *P. sativum*- und *Nicotiana tabaci*-Protoplasten (Kajita et al. 1980).

In hypotonem Medium dehnten sich periphere Symbiosome nicht gleichmäßig aus, sondern durchbrachen lokal die Plasmamembran (Abb. IV.12 G, H), da

diese einen geringeren Widerstand als das Cytosol entgegengesetzte. Dadurch wurde die Plasmamembran lokal perforiert. Kohärentes Cytosol und lokale Plasmamembranschädigung (mechanisch oder osmotisch) können zu nicht-sphärischen infizierten Protoplasten führen, die lichtmikroskopisch einen glatten Rand und elektronenmikroskopisch in Schnittebene eine scheinbar intakte Plasmamembran aufweisen (z.B. Davey et al. 1973). Dies kann zur fehlerhaften Annahme der Intaktheit dieser Zellen führen.

4.4.4.2 Stärkespeicherung in Amyloplasten

Infizierte und nicht-infizierte Zellen indeterminierter Knöllchen speichern Stärke in Amyloplasten (z.B. Abd-Alla et al. 2000). Auch nach Isolation der Protoplasten in zuckerhaltigem oder -freiem Medium konnte Stärke histologisch (Abb. IV.8 J, K) und elektronenmikroskopisch (Abb. IV.12 C, E) nachgewiesen werden. Dies spricht für eine ausreichende Energieversorgung dieser Zellen nach der Isolation (1.3.2.2), was für sekundär aktive, energieabhängige Membrantransportprozesse von Bedeutung ist. In Protoplasten aus physiologisch alten, vermutlich nicht mehr N₂-fixierenden Zellen, war jedoch keine Stärke mehr vorhanden, was mit der vorgeschlagenen Kopplung von Stärkespeicherung und dem Potential zur N₂-Fixierung übereinstimmt (1.3.2.2).

4.4.4.3 Polyhydroxybutyratspeicherung in Bacteroiden

In elektronenmikroskopischen Aufnahmen von *Rhizobium*-Bacteroiden infizierter Protoplasten waren kreisförmige nichtkontrastierte Einschlüsse zu erkennen (Abb. IV.12). Diese Körper werden gewöhnlich als Polyhydroxybutyrat-Granula interpretiert (Streeter 1995). Polyhydroxybutyrat dient als Energiespeicher in Bacteroiden (1.3.2.2) und akkumuliert bei reduzierter N₂-

Fixierung (Appleby 1984). Es ist häufig in *Bradyrhizobium*-Bacteroiden determinierter Knöllchen vorhanden, z.B. bei *Phaseolus vulgaris* (Sutton und Jepsen 1975, Matamoros et al. 1999). *Rhizobium*-Bacteroide indeterminierter Knöllchen, z.B. von *Cicer arietinum* (Lee und Copeland 1994), *Pisum sativum* (Syono et al. 1979) oder *V. faba* (Davey et al. 1980, Trinchant et al. 1994), enthalten fast nie Polyhydroxybutyrat. Auch in Bacteroiden intakter Knöllchen des in vorliegender Arbeit verwendeten Rhizobienstamms waren nur sehr vereinzelt Polyhydroxybutyrat-Granula vorhanden (M.H. Abd-Alla, unveröffentlicht). Die für *Rhizobium*-Bacteroide ungewöhnlich starke Akkumulation von Polyhydroxybutyrat in infizierten Protoplasten (Abb. IV.12) könnte auf die vollständige Hemmung der N₂-Fixierung durch atmosphärische O₂-Konzentration bei gleichzeitig hoher Energieversorgung der Bacteroide zurückzuführen sein.

4.4.4.4 Proteinspeicherung in Vakuolen infizierter Zellen

In dieser Arbeit wurden deutliche Hinweise gefunden, daß Vakuolen infizierter Zellen des *V. faba*-Knöllchens Proteinspeichervakuolen darstellen. In diesen Vakuolen war, ähnlich wie zuvor für *P. sativum*-Knöllchen gezeigt (Vincent und Brewin 2000), elektronenmikroskopisch eine stark kontrastierende griesige Substanz vorhanden (Abb. IV.12 D), bei der es sich wahrscheinlich um Speicherprotein handelte. Auch in anderen vegetativen Geweben, wie dem paraveinalen Mesophyll von *G. max* (Franceschi und Giaquinta 1983), liegt vakuoläres Speicherprotein in dieser Form vor. Die Vakuolen infizierter Zellen enthielten daneben von Doppelmembranen begrenzte tubuläre oder globoide Körper (Abb. IV.12 D). Dabei könnte es sich um Strukturen handeln, die der globoiden Kavität in Proteinspeichervakuolen von Samen analog sind und Proteasen beinhalten (Jiang et al. 2001). Ferner wiesen Färbungen mit Neutralrot auf die Funktion der Vakuole infizierter Zellen als Proteinspeicher-

vakuole hin (Abb. IV.8 H). Dieser als Kationenfalle wirkende Farbstoff akkumuliert in sauren (lytischen) Vakuolen (Lin 1980, Guttenberger 2000). In vorliegender Arbeit akkumulierte Neutralrot in nicht-infizierten Protoplasten (Abb. IV.8 F), nicht jedoch in infizierten (Abb. IV.8 H), obwohl diese osmotisch aktiv waren und Propidiumjodid ausschlossen. Bei intakten Membranen ist eine Nicht-Akkumulation möglich, wenn die Vakuole einen nicht-sauren pH-Wert besitzt. Dies ist ein Charakteristikum von Proteinspeichervakuolen (Paris et al. 1996, Di Sansebastiano et al. 1998).

Proteinspeichervakuolen infizierter Zellen stellen vermutlich einen Puffer zur Nachlieferung von Aminosäuren dar. Die N_2 -Fixierung wird bei erniedrigtem Bedarf jedoch unmittelbar reduziert. Es ist unbekannt, unter welchen Umständen Aminosäuren in vakuoläres Speicherprotein eingebaut werden, wann dieses mobilisiert wird, und welche Transportvorgänge dafür eine Rolle spielen.

5 Membrantransport von Zuckern und Aminosäuren im Knöllchen

5.1 Zielsetzung

Es bestehen fast keine symplastischen Verbindungen zwischen infizierten Zellen des Zentralgewebes von *Vicia faba*-Knöllchen (3.4.3.1). Der Anteil nicht-infizierter Zellen, die infizierte Zellen symplastisch versorgen könnten, ist jedoch relativ gering (3.4.3.2). Daher ist es denkbar, dass ein apoplastischer Schritt auf dem Weg zwischen Leitgewebe und infizierter Zelle vorliegt. In diesem Fall wären Transportvorgänge über Plasmamembranen des Knöllchen-Zentralgewebes an der Allokation von Metaboliten von bzw. zu infizierten Zellen beteiligt (1.4, 1.5). Diese könnten die osmotische Gasdiffusionsbarriere (1.6) sowie die Rückverlagerung feedbackwirksamer Stoffe (1.7) beeinflussen.

Im Fall eines (teil-)apoplastischen Exportwegs für Aminosäuren könnten infizierte Zellen Aminosäuren in den Apoplasten entlassen. Diese Möglichkeit wurde mittels Gewebeinkubationsstudien untersucht. Die in Kapitel 4 entwickelten Protoplastenfraktionen erlaubten die Untersuchung der Kompetenz infizierter und nicht-infizierter zur Aufnahme von Aminosäuren und Zuckern aus dem Zentralgewebeapoplasten.

Sekundär aktive Membrantransportprozesse in Pflanzen werden durch einen elektrochemischen Gradienten angetrieben, der durch die Aktivität einer plasmamembrangebundenen H⁺-ATPase aufgebaut wird (Bush 1993). Daher wurden beide Protoplastenfraktionen hinsichtlich Nettoprotonenabgabe und Energetisierung der gefundenen Transporter untersucht.

5.2 Material und Methoden

5.2.1 Chemikalien

5.2.1.1 Allgemeine Chemikalien

Bezeichnung	Formel	Reinheit	Firma	No.
Ammoniumvanadat	NH_4VO_3	p.a.	Merck	159507
L-Asparagin	$\text{C}_4\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_3$	>99%	Sigma	A8824
L-Asparaginsäure	$\text{C}_4\text{H}_7\text{NO}_4$	>99%	Sigma	A8949
Calciumsulfat	CaSO_4	puriss. p.a.	Fluka	21246
CCCP (Carbonyl cyanid m-chlorophenylhydrazon)	$\text{C}_9\text{H}_5\text{ClN}_4$		Sigma	C2759
Dibutylphthalat	$\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_4$	z. Synth.	Merck	80919
Diisoheptylphthalat	$\text{C}_{32}\text{H}_{34}\text{O}_4$	techn.	Aldrich	37,667-1
Erythrosin B	$\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{O}_5$	>95%	Aldrich	20,096-4
Essigsäure (Eisessig)	$\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$	p.a.	Merck	100063
N-Ethylmaleimid	$\text{C}_6\text{H}_7\text{NO}_2$		Sigma	E1271
D-(-)-Fructose	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	>99,5%	Sigma	F2543
Fusicoccin	$\text{C}_{36}\text{H}_{56}\text{O}_{12}$	~90%	Sigma	F0537
D-(+)-Glucose	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	>99,5%	Sigma	G7528
L-Glutamin	$\text{C}_5\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_3$	>99%	Sigma	G7029
L-Glutaminsäure	$\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_4$	>99%	Sigma	G6904
L-Leucin	$\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_3$	>99%	Fluka	61820
Kaliumhydroxid, Plätzchen	KOH	p.a.	Merck	105033
Kaliumsulfat	K_2SO_4	puriss. p.a.	Fluka	60532
Natriumacetat	$\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$	p.a.	Merck	106268
Natriumazid	NaN_3	>99,5%	Sigma	S2002
Natriumorthovanadat	Na_3VO_4	>95%	Sigma	S6508
Natriumsulfat	Na_2SO_4	puriss. p.a.	Fluka	71960
Ninhydrin	$\text{C}_9\text{H}_{16}\text{O}_4$	p.a.	Merck	106762
Natriumcyanid	NaCN	rein	Merck	106437
Perchlorsäure 70%	HClO_4	p.a.	Merck	100514
Phlorizin dihydrat	$\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{O}_{10}$		Sigma	P3449
2-Propanol	$\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$	p.a.	Merck	109634
D-(+)-Saccharose	$\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$	>99,5%	Fluka	84099
Saccharose / D-Glucose / D-Fructose UV-Test			Roche	716260

5.2.1.2 Radiochemikalien und Szintillationszählung

Bezeichnung	Firma	No.
[³ H]-H ₂ O (von 1974)	APB	TRS3
D-[U- ¹⁴ C]Glucose	APB	CFB96
D-[U- ¹⁴ C]Saccharose	APB	CFB146
L-[1- ¹⁴ C]Leucin	APB	CFA273
[¹⁴ C-carboxyl]-Dextran-carboxyl	biotrend	ARC-115
LumaSafe LSC cocktail	Packard	3087

Für alle Lösungen, Puffer, Medien etc. wurde hochaufgereinigtes (Milli-Q, Millipore, Eschborn) entionisiertes Wasser verwendet.

5.2.2 Inkubationsstudien mit Zentralgewebe

Das Wurzelsystem einer *V. faba*-Pflanze wurde unmittelbar vor dem Experiment vom Spross abgetrennt, unter fließendem Leitungswasser gewaschen und während der Knöllchenpräparation bei 20°C in diesem gelagert. Vom Wurzelsystem entfernte Knöllchen wurden unter einem Binokular mit Inkubationsmedium (5 mM CaSO₄, 1 mM K₂SO₄) bedeckt und wie in 4.2.3.3 beschrieben in Cortex und infiziertes Zentralgewebe dissektiert (Abb. IV.2 A). Der apikale (meristematische) und basale (seneszente) Teil des Zentralgewebes wurden verworfen. Unmittelbar nach der Dissektion wurden Zentralgewebe und (in einigen Experimenten) Cortextgewebe auf ein im Inkubationsmedium befindliches Nylonnetz (120 µm Maschen) übertragen (Abb. IV.2 B), das an einem Kunststoffring (5 mm Ø) befestigt war. Pro Ansatz wurden 5-10 Gewebestücke präpariert, was ca. 15 min in Anspruch nahm. Die Gewebestücke wurden durch Überführen des Netzes in frisches Inkubationsmedium mehrmals gewaschen. Für Messungen wurde das Netz mit den Gewebestücken in ein 2-3 mL Inkubationsmedium enthaltendes zylindrisches Glasgefäß überführt, in dem sich ein rotierender Magnetrührstab (3 mm) befand. Gleiche Gewebeproben wurden mehrmals inkubiert. Zwischen den

Inkubationen wurde das Gewebe in Inkubationsmedium gewaschen. Das Inkubationsmedium enthielt z.T. Effektoren (NaN_3 , Na_3VO_4 , Fusicoccin; siehe 5.3.1). In diesem Fall wurde der Kontrolle das Effektor-Lösungsmittel in gleicher Konzentration zugesetzt. Die Inkubationen fanden in einer Inkubationshaube (Certomat HK, Braun, Melsungen) bei 25°C statt. Nach den Messungen wurde die Frischmasse des Gewebes ermittelt und das Inkubationsmedium in flüssigem N_2 tiefgefroren.

Die pH-Veränderungen im Inkubationsmedium wurden mit einer Mikro-pH-Einstabmesskette (InLab 423, Mettler, Gießen) an einem Präzisions-pH-Meter (CG 805, Schott, Mainz) gemessen und mit einem Potentiometerschreiber (L 6, Linseis, Selb) aufgezeichnet. Die pH-Elektrode wurde vor der Messung 30 min in Inkubationsmedium gelagert. Die quantitative Bestimmung der ins Inkubationsmedium abgegebenen Aminoverbindungen erfolgte nach der Ninhydrinmethode (Rosen 1957).

5.2.3 Protonenabgabe und Zuckeraufnahme durch nicht-sphärische infizierte „Protoplasten“

Bevor bekannt war, dass nicht-sphärische Protoplasten keine intakte Plasmamembran besitzen (4.4), wurden einige Transportstudien mit nach der Ein-Schritt-Methode (4.2.2) isolierten nicht-sphärischen infizierten „Protoplasten“ durchgeführt. Zur Bestimmung von Nettoprotonenabgabe und Nettozuckeraufnahme wurden diese bei 25°C in einem Testmedium (600 mM Sorbitol, 5 mM CaSO_4 , 1 mM K_2SO_4) inkubiert, dem teilweise Effektoren (Na_3VO_4 , NaN_3) und Zucker (Glucose, Fructose, Saccharose) in unterschiedlichen Konzentrationen zugesetzt waren (5.3.2.1). Unmittelbar vor den Messungen wurde das Protoplastenmedium durch viermaliges Waschen der Protoplastensuspension mit Testmedium gegen dieses ausgetauscht. Die pH-

Veränderungen im Testmedium wurden wie in 5.2.2 beschrieben gemessen. Die pH-Elektrode wurde vor der Messung 30 min in Testmedium gelagert.

Zur Bestimmung der Zuckeraufnahme wurden Aliquods (1 mL) der homogenen Protoplastensuspension abzentrifugiert (10 min, 100 *g*). Der Überstand wurde in flüssigem N₂ tiefgefroren. Zuckerkonzentrationen (Glucose, Fructose, Saccharose) wurden mit einem Enzym-Testsatz (Roche, Darmstadt) photometrisch bestimmt (Cary 4 Bio, Varian, Darmstadt).

5.2.4 Protonenabgabe durch sphärische infizierte und nicht-infizierte Protoplasten

Infizierte und nicht-infizierte Protoplasten wurden wie in 4.2.3 beschrieben isoliert (100 Knöllchen pro Isolation), separiert, in Medium (SM 2b, siehe 4.2.3) aufgenommen und aliquotiert (3 x 1 mL). Zur Messung der Nettoprotonenabgabe der Protoplasten wurde das Medium durch dreimaliges Waschen mit 4 mL Testmedium (2,5 mM K₂SO₄, 1,0 mM MgSO₄, 0,5 mM CaCl₂, 390 mM Mannitol) gegen dieses ausgetauscht. Die Pelletierung erfolgte dabei durch Zentrifugation (infizierte Fraktion: 1 min, 8 *g*; nicht-infizierte Fraktion: 1 min, 80 *g*). Nach der letzten Zentrifugation wurde der Überstand sofort abgenommen und Testmedium (500 µL) zugegeben, ohne das Pellet zu resuspendieren. Das Testmedium enthielt z.T. Effektoren (NaN₃, Na₃VO₄, CCCP, Fusicoccin; siehe 5.3.2.3). In diesem Fall wurde der Kontrolle das Effektor-Lösungsmittel in gleicher Konzentration zugesetzt. Alle Arbeiten fanden bei 20°C statt. Die pH-Veränderungen im Testmedium wurden wie in 5.2.2 beschrieben gemessen. Die pH-Elektrode wurde vor der Messung 30 min in Testmedium gelagert.

5.2.5 Aufnahme ^{14}C -markierter Metabolite durch sphärische infizierte und nicht-infizierte Protoplasten

5.2.5.1 Durchführung der Aufnahmestudien

Zur Klärung der Frage, ob nicht-infizierte und infizierte Zellen des Zentralgewebes in der Lage sind, Metabolite aus dem Apoplasten aufzunehmen, wurden aus beiden Zelltypen Protoplasten isoliert, mittels isopyknischer Dichtegradientenzentrifugation getrennt (4.2.3) und am gleichen Tag für Aufnahmestudien verwendet. Die Aufnahme der Verbindungen D-[U- ^{14}C]Glucose, D-[U- ^{14}C]Saccharose, L-[1- ^{14}C]Leucin und [^{14}C -carboxyl]-Dextran-carboxyl wurde untersucht. Die spezifischen Aktivitäten der radioaktiven Stammlösungen und die in Aufnahmeexperimenten eingesetzten Aktivitäten sind aus Tab. V.1 ersichtlich.

Tab. V.1. Spezifische Aktivitäten von $^3\text{H}_2\text{O}$ und ^{14}C -markierten Stoffen, sowie für Aufnahmeexperimente eingesetzte Aktivitäten in Suspensionen nicht-infizierter und infizierter Protoplasten.

Stoff	spezifische Aktivität [MBq mL $^{-1}$]	Aktivität in Protoplastensuspension	
		nicht-infiziert [kBq mL $^{-1}$]	infiziert [kBq mL $^{-1}$]
$^3\text{H}_2\text{O}$	37	370	185
^{14}C -Glc	7,40	74,0	37,0
^{14}C -Suc	7,40	74,0	37,0
^{14}C -Leu	1,85	24,7	9,25
^{14}C -Dex	1,85	18,5	37,0

Für Aufnahmeexperimente wurde die Protoplastensuspension in silikonisierte Reaktionsgefäße (2,2 mL, SafeSeal, Peqlab) aliquotiert, in denen sich $^3\text{H}_2\text{O}$ befand. Dieses diente der Bestimmung des Protoplastenvolumens (Ritte et al.

1999). Um eine Gleichverteilung des $^3\text{H}_2\text{O}$ in Medium und Protoplasten zu ermöglichen, wurde dieses mindestens 30 min vor Beginn der Aufnahmeexperimente zugegeben. Aus den bekannten Parametern $^3\text{H}_2\text{O}$ -Aktivität (DPM) in Protoplasten und Suspension, sowie Volumen des Mediums kann das Protoplastenvolumen wie folgt errechnet werden (eckige Klammer = DPM):

$$\text{Volumen}_{\text{Protopl.}} = \frac{[\text{}^3\text{H}]_{\text{Protoplasten}}}{[\text{}^3\text{H}]_{\text{Suspension}}} \cdot \text{Volumen}_{\text{Medium}} \quad (1)$$

Da die Ausbeute bei verschiedenen Isolationen unterschiedlich war und die Protoplastensuspensionen zur Schonung des Zellmaterials nicht vollständig homogenisiert werden konnten, schwankte die Protoplastenmenge je Aufnahmeprobe. Je nach Fragestellung wurden für ein Experiment 50-100 Knöllchen sezirt, wobei die Ausbeute ca 20-70 nL nicht-infizierte und 100-300 nL infizierte Protoplasten pro Knöllchen betrug. Pro Aufnahmeprobe (100 μL Suspension) wurden 50-150 nL nicht-infizierte und 300-900 nL infizierte Protoplasten eingesetzt.

Die Metabolitenaufnahme wurde gestartet durch gleichzeitige Zugabe der markierten und unmarkierten Metabolite zur Protoplastensuspension und vorsichtiges Überkopfschwenken. Bei Effektorexperimenten wurden diverse Inhibitoren und Stimulatoren 3 min vor Aufnahme start zugegeben (siehe 5.3.2.4-6). Dabei erhielt die Kontrollvariante eine äquivalente Lösungsmittelmenge (Ethanol oder Wasser) wie die Effektorvarianten.

Während der Aufnahmeperiode wurde die Protoplastensuspension in einem Heizblock bei $25 \pm 1^\circ\text{C}$ inkubiert und zwei Minuten vor Reaktionsstop wieder vorsichtig homogenisiert. Die Reaktion wurde beendet durch eine modifizierte Ölzentrifugationsmethode (Klingenberg und Pfaff 1967): Ein Aliquot (100 μL) der Protoplastensuspension wurde in ein PE-Mikroreaktionsgefäß (5,7x46 mm;

400 μL , Sarstedt) pipettiert, in dem sich eine Phthalatmischung (200 μL) auf einem HClO_4 -Kissen (60 mL L^{-1} ; 10 μL) befand. Da die Dichte der Phthalatmischung zwischen der der Protoplasten und der des Mediums lag, konnten Protoplasten und Medium durch Zentrifugation (1 min, 12 000 Umdr. min^{-1} ; 2-MK, Sigma, Osterode) getrennt werden. Die Phthalatmischung zur Abtrennung der infizierten Protoplasten hatte eine Dichte von 1,037 kg L^{-1} und setzte sich zusammen aus 1 Teil Diisoheptylphthalat (DHP) und 5,2 Teilen Dibutylphthalat (DBP); für die nicht-infizierte Fraktion hatte sie eine Dichte von 1,009 kg L^{-1} und bestand aus 1,9 Teilen DHP und 1 Teil DBP. Nach dem Aufnahmeexperiment wurden die Reaktionsgefäße eingefroren (-20°C). Zur Flüssigkeitsszintillationszählung der Protoplastenpellets wurde die Spitze des gefrorenen Röhrchens abgeschnitten, kopfüber in 200 μL SDS (10 g L^{-1} , in 1,5 mL Reaktionsgefäß) gegeben und intensiv geschüttelt. Nach Zentrifugation (5 min, 13 000 Umdr. min^{-1} ; Biofuge, Heraeus, Hanau) wurden 170 μL der wässrigen oberen Phase in Minivials mit 3 mL Szintillationscocktail (Lumasafe, Packard) gegeben. In der unteren Phase (Phthalat) war keine Aktivität nachweisbar. Zur Bestimmung der ^{14}C - und ^3H -Aktivitäten im Medium wurden 3×10^4 μL Suspension in 3 mL Szintillationscocktail gegeben. Die Bestimmung der Aktivitäten (Zerfälle pro Minute, DPM) erfolgte mit einem Flüssigkeitsszintillationszähler (Packard 2700 TR, Canberra-Packard, Dreieich) mit automatischer Korrektur für Background und Quench. Die Energiefenster für ^3H und ^{14}C waren 0 - 12 keV bzw. 12 - 156 keV.

5.2.5.2 Errechnung der Aufnahmezeiten

Die Bestimmung von Mediumverschleppung und Membranintegrität erfolgte durch Aufnahmeexperimente mit [^{14}C -carboxyl]-Dextran-carboxyl. Dieses ist aufgrund seiner Molekülgröße (MW 70.000) membranimpermeabel und gelangt daher nur mit anhaftendem Medium und defekten Protoplasten durch

die Phthalatschicht ins Pellet (Getz et al. 1987). Die Veränderung der Membranintaktheit wird daher durch das Verhältnis der $^{14}\text{C}/^3\text{H}$ -Quotienten in Medium und Protoplasten zu verschiedenen Inkubationszeitpunkten widergespiegelt, das wie folgt berechnet wird (eckige Klammern = DPM):

$$\text{Dextran - Ausschluß: } \frac{([\text{C}^{14}] \cdot [\text{H}^3]^{-1})_{\text{Protoplasten}}}{([\text{C}^{14}] \cdot [\text{H}^3]^{-1})_{\text{Suspension}}} \quad (2)$$

Die Konzentration aufgenommener ^{14}C -markierter Metabolite (Glc, Suc, Leu) im Protoplastenpellet wurde ermittelt aus den $^{14}\text{C}/^3\text{H}$ -Aktivitätsquotienten in Medium und Protoplasten, sowie der Metabolitenkonzentration im Medium (eckige Klammern = Konzentrationen, DPM):

$$[\text{Metabolit}]_{\text{Protoplasten}} = \frac{([\text{C}^{14}] \cdot [\text{H}^3]^{-1})_{\text{Protoplasten}}}{([\text{C}^{14}] \cdot [\text{H}^3]^{-1})_{\text{Suspension}}} \cdot [\text{Metabolit}]_{\text{Suspension}} \quad (3)$$

Übersteigt der $^{14}\text{C}/^3\text{H}$ -Quotient des Protoplastenpellets den des Mediums, so liegt eine ^{14}C -Akkumulation gegen den Aktivitätsgradienten vor.

Aufnahmeraten wurden auf die Plasmamembranoberfläche (mm^2) bezogen. Diese wurde ermittelt durch Bestimmung des mittleren Protoplastendurchmessers in mikroskopischen Aufnahmen repräsentativer Isolationen. Infizierte Protoplasten besaßen einen Durchmesser von $52,2 \pm 0,4 \mu\text{m}$ (SE; $n=200$), nicht-infizierte $35,3 \pm 0,6 \mu\text{m}$ (SE; $n=200$). Somit enthielt 1 mL kugelförmiger Protoplasten eine Plasmamembranfläche von 115 mm^2 (infiziert) bzw. 170 mm^2 (nicht-infiziert).

5.2.6 Saccharosespaltung in Suspensionen infizierter und nicht-infizierter Protoplasten

Infizierte und nicht-infizierte Protoplasten aus dem Zentralgewebe von 80 *V. faba*-Knöllchen wurden wie in 4.2.3 beschrieben isoliert und in 3 mL SM 2b (nicht-infizierte Fraktion) bzw. SM 2b mit 10% Ficoll (infizierte Fraktion) aufgenommen. Die Suspensionen wurden in drei silikonisierte Reaktionsgefäße aliquotiert. Das Experiment wurde gestartet durch Zugabe von 10, 100 oder 1000 μM Saccharose und vorsichtiges Überkopfschwenken. Die Reaktion wurde beendet durch Phthalatzentrifugation (5.2.5.1) nach 5, 10 und 15 Minuten. Die Phthalatröhrchen wurden unmittelbar darauf in flüssigem N_2 schockgefroren und bei -20°C gelagert. Die Konzentrationen von Glucose, Fructose und Saccharose im Inkubationsmedium wurden enzymatisch bestimmt (Roche, Darmstadt).

5.3 Ergebnisse

5.3.1 Transportstudien mit Knöllchen-Zentralgewebe

5.3.1.1 Nettoprotonenabgabe durch Zentralgewebe

Die Fähigkeit von Knöllchengewebe zur H^+ -Nettoabgabe wurde durch Inkubation von Cortex und Zentralgewebe in Inkubationsmedium (5 mM CaSO_4 , 1 mM K_2SO_4) untersucht. Beide Gewebe säuerten das Medium an (Abb. V.1). In vielen Fällen kehrte sich eine ursprünglich messbare pH-Absenkung jedoch in einen pH-Anstieg um (Abb. V.1 A).

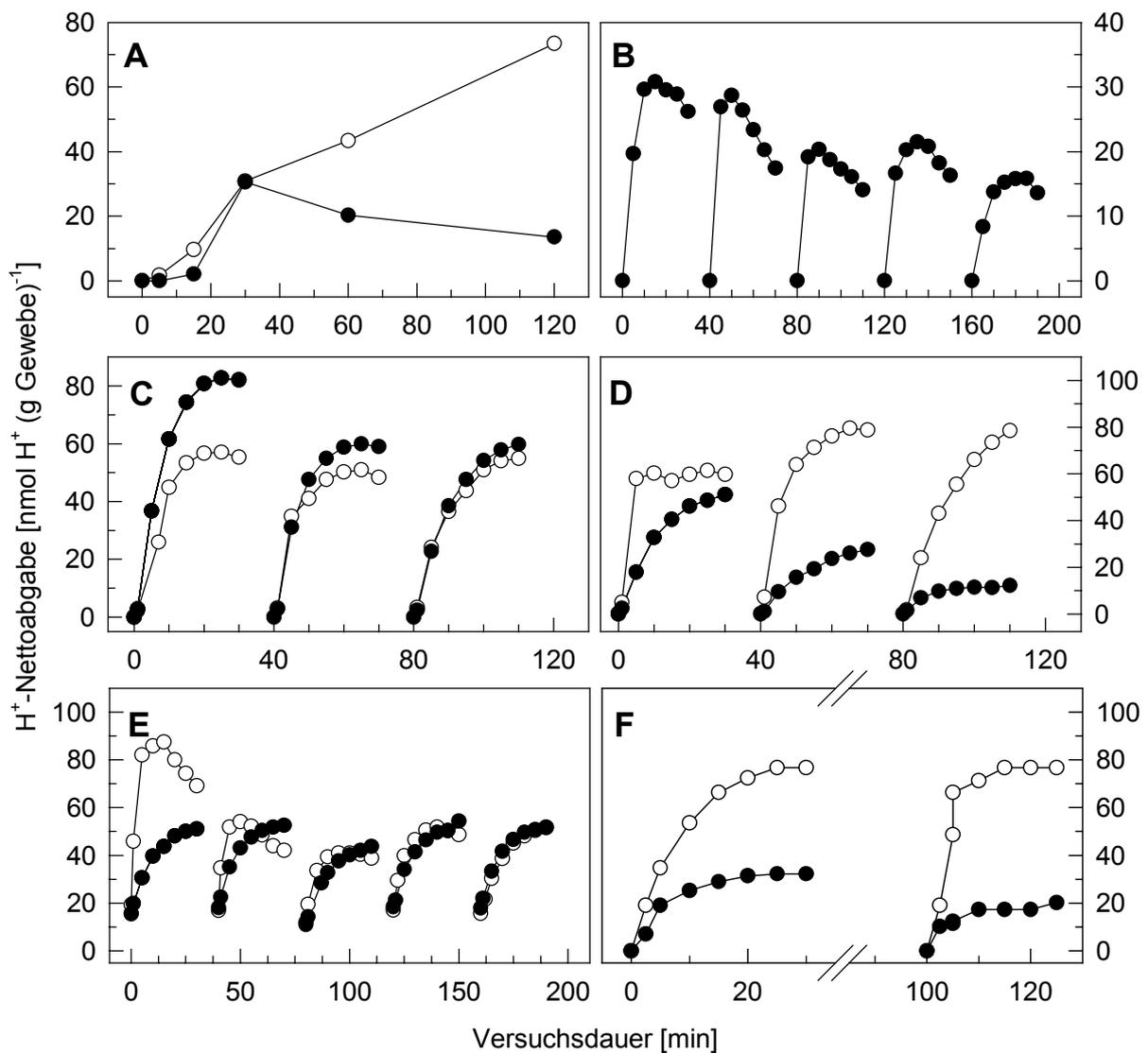


Abb. V.1. H⁺-Nettoabgabe durch infiziertes Gewebe in Testmedium (5 mM CaSO₄, 1 mM K₂SO₄; ca. 35 mg Gewebe in 3 mL Medium). **A.** Cortex (weiße Symbole) und Zentralgewebe (schwarze Symbole) wurden vor der Inkubation separiert und getrennt inkubiert. **B.** Wiederholte Inkubation der gleichen Probe infizierten Gewebes. **C.** Effekt von Fusicoccin (5 μM; schwarze Symbole) im Inkubationsmedium. **D.** Effekt von Vanadat (500 μM Na₃VO₄, schwarze Symbole) gegenüber Sulfat (750 μM Na₂SO₄, weiße Symbole) im Inkubationsmedium. **E.** Effekt von Azid (1 mM NaN₃, schwarze Symbole). **F.** Wiederholung von Experiment E. Bei B-F wurde die gleiche Gewebeprobe mehrmals inkubiert. Ausgangs-pH war in allen Experimenten 6,5-6,7. Werte stammen aus Einzelexperimenten. Experiment D wurde einmal wiederholt mit vergleichbarem Ergebnis.

Diese scheinbare Nettoprotonenaufnahme wurde nur bei infiziertem Gewebe, nicht aber bei Cortexgewebe beobachtet und war reproduzierbar bei wiederholter Inkubation der gleichen Gewebeprobe (Abb. V.1 B). Der Effekt trat jedoch nicht in allen Experimenten auf (Abb. V.1 C, D).

Die H^+ -Nettoabgabe durch infiziertes Gewebe war stimulierbar durch Fusicoccin, einem Stimulator der P-Typ H^+ -ATPase (Abb. V.1 C) und hemmbar durch Vanadat, einem Inhibitor dieses Enzyms (Abb. V.1 D). Azid, ein Inhibitor der Atmungskette und der F_0F_1 -ATPase, wirkte meist hemmend auf die Nettoprotonenabgabe (Abb. V.1 E, F) und verhinderte den anschließenden pH-Anstieg (Abb. V.1 E). Aufgrund der geringen Anzahl an Wiederholungen ist die Aussagekraft der Inhibitor- und Stimulatorexperimente jedoch begrenzt.

5.3.1.2 Aminosäurenabgabe durch Zentralgewebe

Wurde herausseziertes infiziertes Gewebe inkubiert, so gab dieses Aminoverbindungen ins Inkubationsmedium ab, deren Konzentration mittels Ninhydrin messbar war. Dies wurde bei Cortexgewebe nicht beobachtet (Abb. V.2 A). Bei mehrfacher Inkubation der gleichen Gewebeprobe wurde eine gleichmäßig hohe Abgaberate über einen längeren Zeitraum beobachtet (Abb. V.2 B). Die Abgaberate variierte stark zwischen einzelnen Experimenten (ca. $10-40 \mu\text{mol } -\text{NH}_3 \text{ (g Gewebe} \cdot \text{h)}^{-1}$). Sie war stimulierbar durch Fusicoccin (Abb. V.2 C), eine Vanadathemmbarkeit war nicht feststellbar (Abb. V.2 D). Bei den Vanadatversuchen waren die Abgaberraten der Kontrolle jedoch sehr niedrig. Eine Hemmung der Aminogruppenabgabe durch Azid trat nur bei hohen Abgaberraten der Kontrolle auf (Abb. V.2 E, F). Aufgrund der geringen Anzahl an Wiederholungen ist die Aussagekraft der Inhibitor- und Stimulatorexperimente auch hier beschränkt.

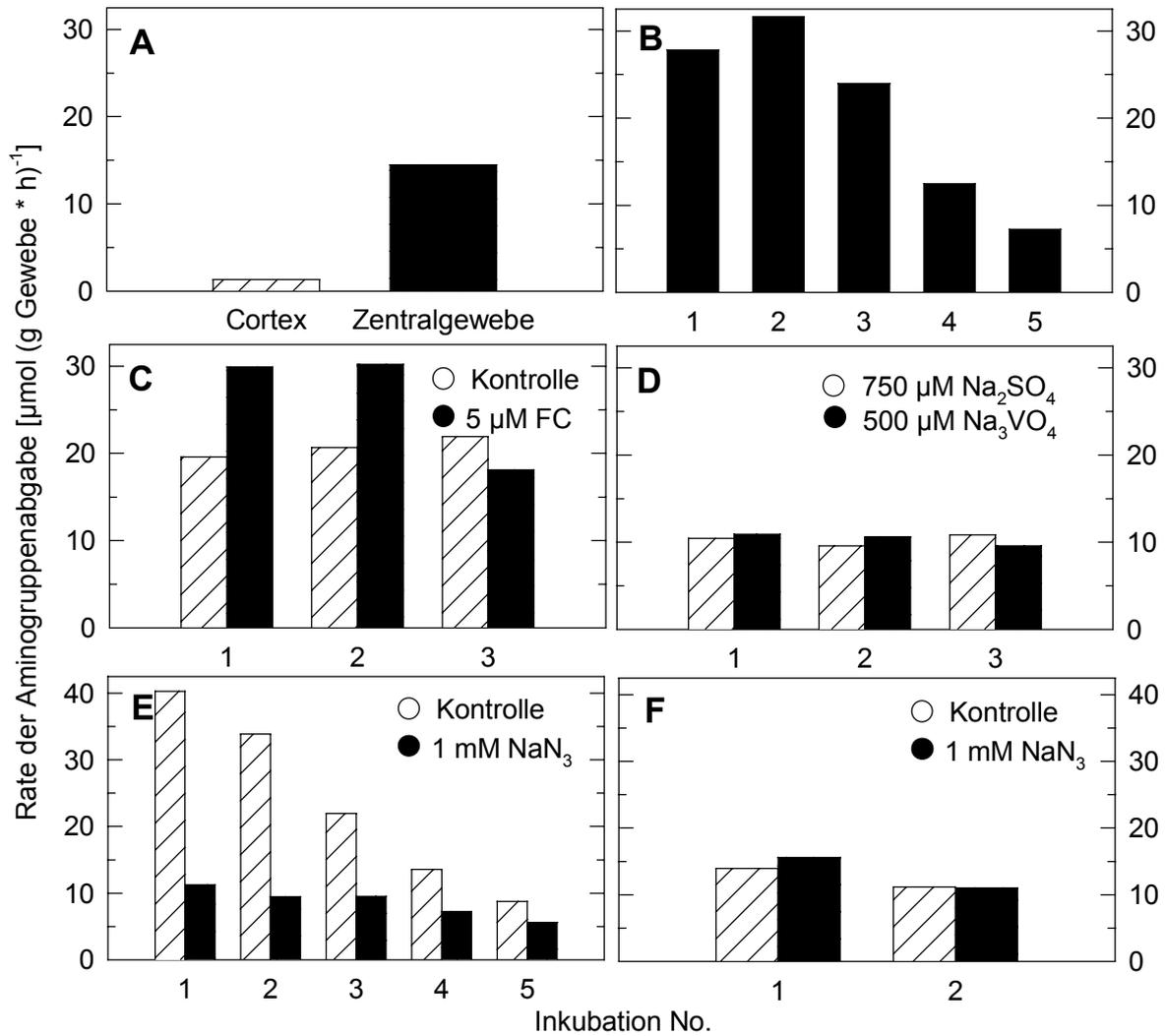


Abb. V.2. Abgabe von Aminogruppen durch infiziertes Zentralgewebe (ca. 35 mg Gewebe in 3 mL Medium) in Testmedium (5 mM CaSO_4 , 1 mM K_2SO_4). **A.** Cortex (weiß) und Zentralgewebe (schwarz) wurden vor der Inkubation separiert und getrennt inkubiert. **B.** Wiederholte Inkubation der gleichen Probe infizierten Gewebes. **C.** Effekt von Fusicoccin (5 μM ; schwarz) im Inkubationsmedium. **D.** Effekt von Vanadat (500 μM Na_3VO_4 , schwarz) gegenüber Sulfat (750 μM Na_2SO_4 , weiß) im Inkubationsmedium. **E.** Effekt von Azid (1 mM NaN_3 , schwarz). **F.** Wiederholung von Experiment E. Das Gewebe wurde vor Probenahme jeweils 30 min inkubiert (A: 180 min). A-F entsprechen den Experimenten A-F in Abb. V.1. Bei B-F wurde die gleiche Gewebeprobe mehrmals inkubiert. Die Probenahme erfolgte nach beendeter pH-Messung (Abb. V.1). Werte stammen aus Einzelerperimenten. Experiment D wurde einmal wiederholt mit vergleichbarem Ergebnis.

Die starke Variation der Aminogruppenabgabe konnte nicht auf eine Tageszeitenabhängigkeit zurückgeführt werden, da die Abgaberaten bei Inkubationsstartzeitpunkten von 8:00 bis 17:00 nicht stark schwankten (Abb. V.3 A). Wurde hingegen das infizierte Gewebe transversal halbiert und beide Hälften getrennt inkubiert, so wies das apikale (jüngere) Gewebe eine höhere Abgaberate auf als das basale (ältere) Gewebe (Abb. V.3 B).

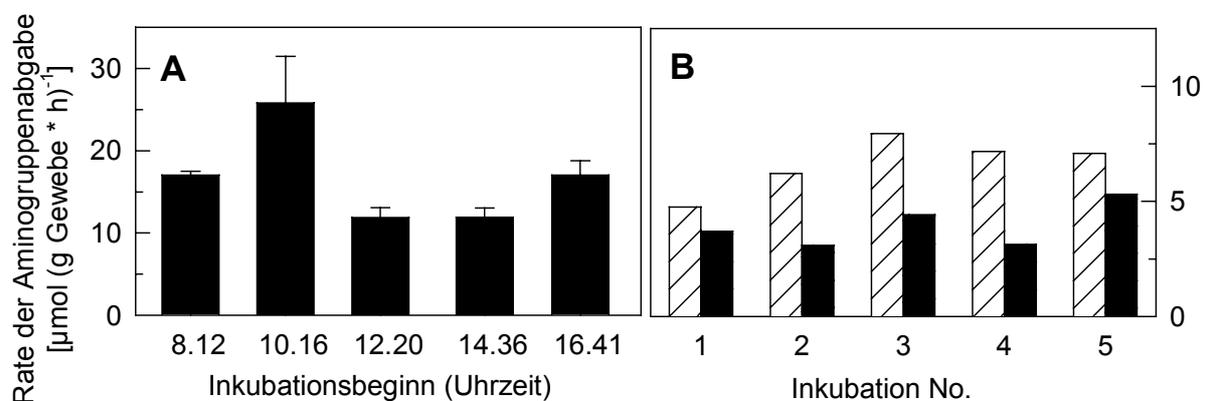


Abb. V.3. Abgabe von Aminogruppen durch infiziertes Zentralgewebe (ca. 35 mg Gewebe in 3 mL Medium) in Testmedium (5 mM CaSO_4 , 1 mM K_2SO_4). **A.** Knöllchen wurden zu verschiedenen Tageszeiten seziiert. Mittelwert \pm SE aus drei Inkubationen (je 60 min) pro Gewebeprobe. **B.** Das Zentralgewebe wurde vor der Inkubation in einen apikalen jungen (weiß) und einen basalen alten (schwarz) Teil geteilt. Die Gewebeprobe wurden fünf Mal inkubiert (je 60 min). Werte stammen aus Einzelexperimenten.

5.3.2 Transportstudien mit Protoplasten

5.3.2.1 Protonenabgabe und Zuckeraufnahme durch nicht-sphärische infizierte „Protoplasten“

Nach herkömmlichen Methoden (4.2.2) isolierte, nicht-sphärische „Protoplasten“ wurden auf ihre Fähigkeit zur Nettoabgabe von Protonen und Nettoaufnahme von Zuckern untersucht. Diese Protoplasten mit defekter Plasmamembran (4.4) säuerten das Testmedium (600 mM Sorbitol, 5 mM CaSO_4 , 1 mM K_2SO_4) an. Diese Ansäuerung konnte teilweise durch Vanadat und vollständig durch Azid inhibiert werden (Abb. V.5 A, C).

Daneben führte die Präsenz nicht-sphärischer „Protoplasten“ zur Abnahme der Glucosekonzentration eines glucose-, fructose- und saccharosehaltigen Inkubationsmediums (Abb. V.5 B, D). Die Glucoseaufnahme war hemmbar durch Azid, aber nicht durch Vanadat. Fructose und Saccharose wurden nicht aufgenommen. Die Desintegration der „Protoplasten“ durch fünfminütiges Vortexen änderte die beschriebenen Transporteigenschaften in keinsten Weise (Abb. V.5 A-D).

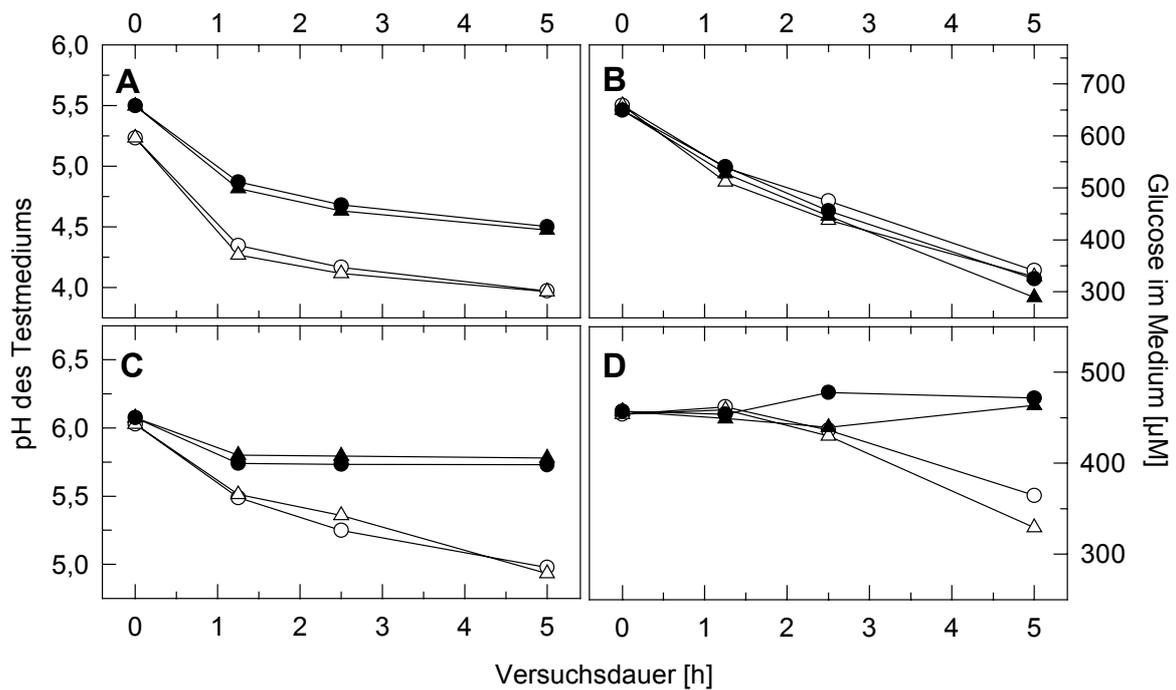


Abb. V.5. Ansäuerung des Mediums (A, C) und Aufnahme von Zuckern (B, D) durch nicht-sphärische infizierte „Protoplasten“ (Kreise) und gevortexte „Protoplasten“ (5 min Vortex, Dreiecke) aus Knöllchen-Zentralgewebe. Die homogene Protoplastensuspension wurde vor dem Versuch in 1 mL Aliquots geteilt (Zell-FM pro Aliquod: A, B: 20 mg; C, D: 25 mg). **A, B.** Effekt von Vanadat (500 μM Na_3VO_4 , schwarze Symbole) gegenüber Sulfat (750 μM Na_2SO_4 , weiße Symbole) im Inkubationsmedium. **C, D.** Effekt von Azid (1 mM NaN_3 , schwarze Symbole) gegenüber Kontrolle (weiße Symbole). Einzelexperimente; Werte von A und B bzw. C und D stammen aus dem gleichen Experiment. Wiederholungsexperimente mit vergleichbarem Ergebnis wurden durchgeführt zu Effekten von Vanadat und Azid auf Ansäuerung, sowie von Vortexen auf Zuckeraufnahme.

5.3.2.2 Bestimmung der Membranintaktheit von Protoplasten mittels ^{14}C -Dextran-Ausschluss

Neue Methoden zur Isolation und Separation von Zentralgewebeprotoplasten ermöglichten erstmals die Durchführung von Aufnahmestudien mit intaktem Material aus diesem Gewebe. Dazu war es essentiell, dass der Anteil Protoplasten mit defekter Plasmamembran über den Zeitraum der

Metabolitenaufnahme nicht anstieg. Zur Sicherstellung, dass Homogenisations- und Pipettierschritte nicht zur Schädigung der Protoplasten führten, wurden zu verschiedenen Zeitpunkten der Methodenentwicklung Testinkubationen mit membranimpermeablem ^{14}C -Dextran (MW: 70.000) durchgeführt. Dabei wurde das Verhältnis der $^{14}\text{C}:$ ^3H -Quotienten in Medium und Protoplasten nach unterschiedlichen Inkubationszeiten verglichen (5.2.5.2). Das Verhältnis blieb sowohl bei infizierten, als auch bei nicht-infizierten Protoplasten während des Aufnahmezeitraums konstant (Abb. V.4). Schädigung der Protoplasten durch Hitze- (15 min bei 60°C) oder Gefrier-Auftau-Behandlung erhöhte den ^{14}C -Anteil in infizierten Protoplasten im Vergleich zum Medium stark, d.h. die Plasmamembran desintegrierte. Das Verhalten lysierter nicht-infizierter Protoplasten konnte nicht untersucht werden, da diese eine geringere Dichte als die eingesetzte Phthalatmischung besaßen und daher nicht vom Medium abgetrennt werden konnten.

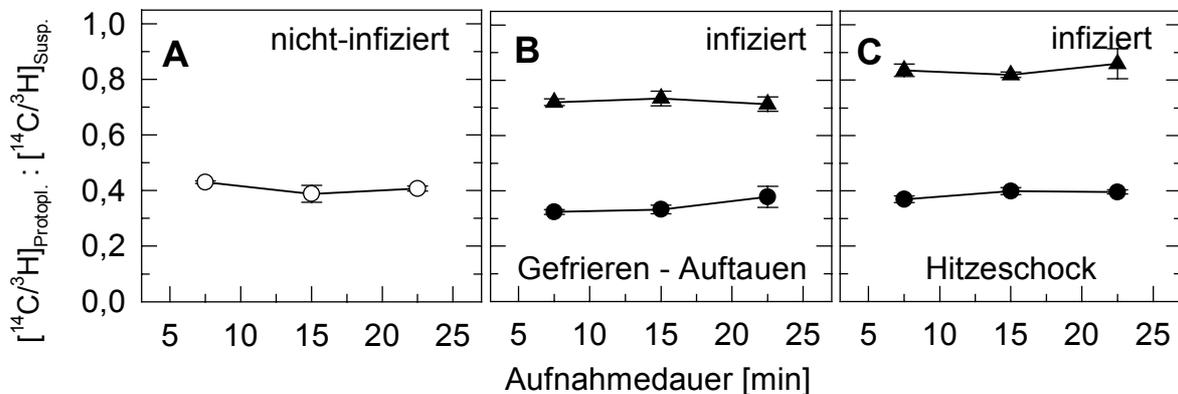


Abb. V.4. ^{14}C -Dextran-Ausschluss durch Fraktionen nicht-infizierter (A) und infizierter (B, C) Protoplasten, erfasst als Aktivitätsverhältnis des ^{14}C -Dextran: $^3\text{H}_2\text{O}$ -Quotienten in Protoplasten und Medium. Protoplasten wurden entweder nicht behandelt (Kreise) oder vor dem Aufnahmeexperiment einer Gefrier-Wiederauftau-Behandlung (B, Dreiecke) oder einer Hitzebehandlung (C, 15 min bei 60°C , Dreiecke) unterzogen. Diese Behandlungen führten zu höherer Dextranakkumulation. Werte sind Mittelwerte aus drei Proben \pm SE.

5.3.2.3 Protonenabgabe durch sphärische infizierte und nicht-infizierte Protoplasten

Es wurde untersucht, ob sphärische infizierte und nicht-infizierte Protoplasten in der Lage sind, das Inkubationsmedium durch Nettoprotonenabgabe anzusäuern. Dazu wurden Protoplasten nach der in 4.2.3 beschriebenen Methode isoliert und separiert. Sowohl infizierte als auch nicht-infizierte Protoplasten gaben Protonen ins Inkubationsmedium ab (Abb. V.6). Die Ansäuerung wurde durch osmotische Zerstörung der Protoplasten in hypotonem Medium unterbunden (Abb. V.6 A, B). Der Einfluss von Effektoren auf die pH-Absenkung im Medium wurde ermittelt, indem die Protoplastensuspension zunächst ohne, dann mit Effektor inkubiert wurde. Dadurch erübrigte sich die Feststellung einer Bezugsbasis. Fusicoccin stimulierte die H⁺-Nettoabgabe nicht-infizierter Protoplasten, war jedoch bei infizierten Protoplasten ohne Effekt (Abb. V.6 C, D). Erythrosin B und Vanadat, beides Inhibitoren der Plasmamembran-H⁺-ATPase, hemmten die H⁺-Nettoabgabe beider Zelltypen (Abb. V.6 E-H).

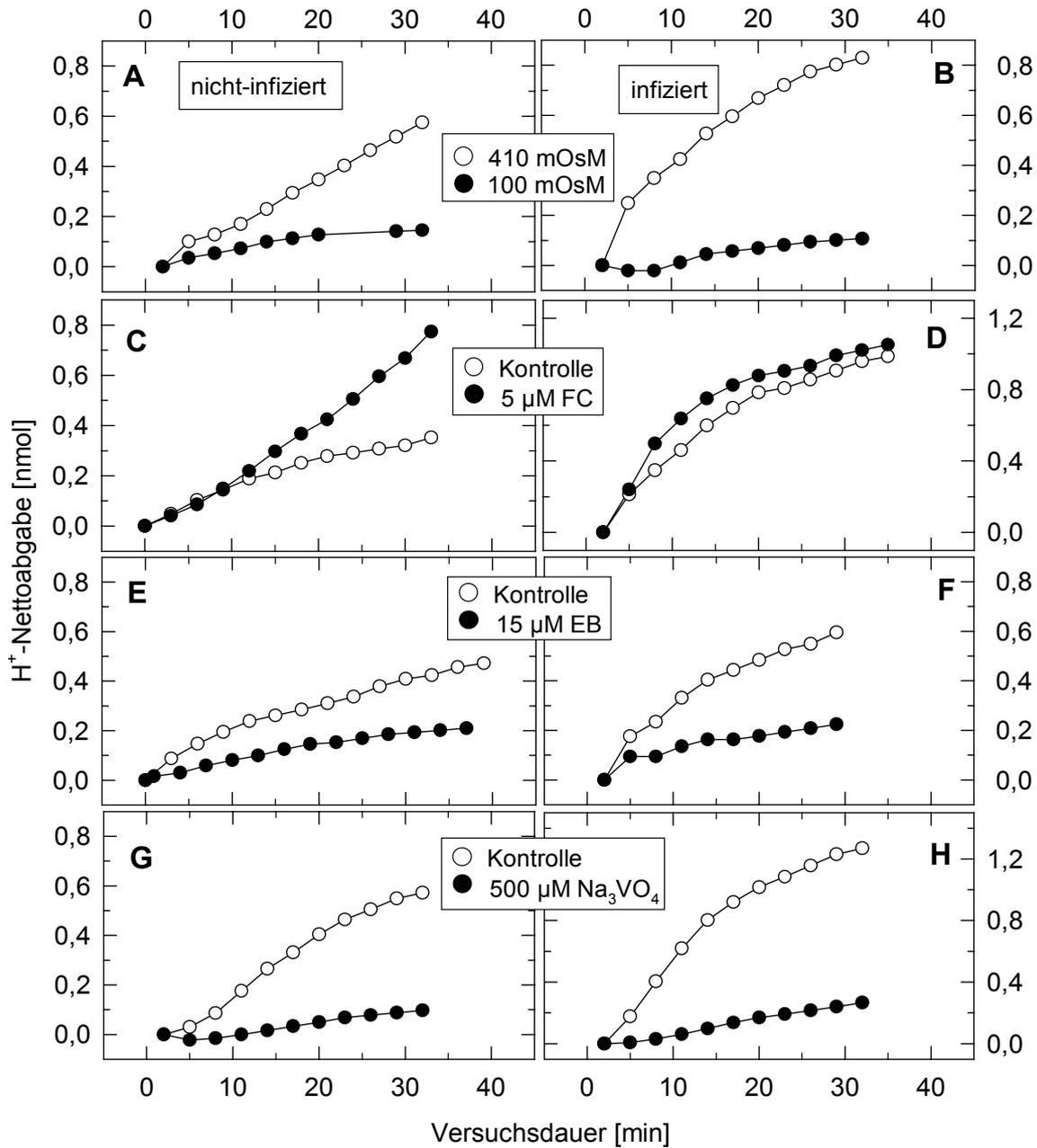


Abb. V.6. Nettoprotonenabgabe durch Fraktionen nicht-infizierter (A, C, E, G) und infizierter (B, D, F, H) Protoplasten. **A, B.** Effekte von niedriger Mediumosmolalität. Die Protonenabgabe wurde zunächst bei 410 mOsM gemessen. Danach wurden die Protoplasten in hypotonem Medium (100 mOsM) zum Platzen gebracht und mit diesem gewaschen. **C-H.** Effekte von 5 μM Fusicoccin (FC; C, D), 15 μM Erythrosin B (EB; E, F) und 500 μM Vanadat (Na₃VO₄, G, H). Die Protonenabgabe der gleichen Probe wurde zunächst ohne, danach mit Effektor gemessen. Die Effektoren wurden 2 min vor Start der pH-Messung zugegeben. Die Daten stammen aus Einzelexperimenten. Die Experimente wurden einmal wiederholt mit vergleichbarem Ergebnis.

5.3.2.4 Glucoseaufnahme durch sphärische infizierte und nicht-infizierte Protoplasten

Kinetik der Glucoseaufnahme

Die Aufnahme von ^{14}C -Glucose durch nicht-infizierte und infizierte Protoplasten wurde bei Konzentrationen zwischen $10\ \mu\text{M}$ und $20\ \text{mM}$ untersucht. In ersten Versuchen wurde die ^{14}C -Akkumulation zu drei Zeitpunkten (5, 15, 30 min bzw. 5, 10, 15 min) in drei Parallelproben ermittelt (Abb. V.7). Die Aufnahme verlief mindestens 30 min linear. Die Parallelproben wiesen eine geringe Streuung auf. Aus der Steigung der Regressionsgeraden konnte die Aufnahme rate abgelesen werden. Der y-Achsenabschnitt der Regressionsgerade stellt die Verschleppung von ^{14}C -Glucose mit anhaftendem Medium dar.

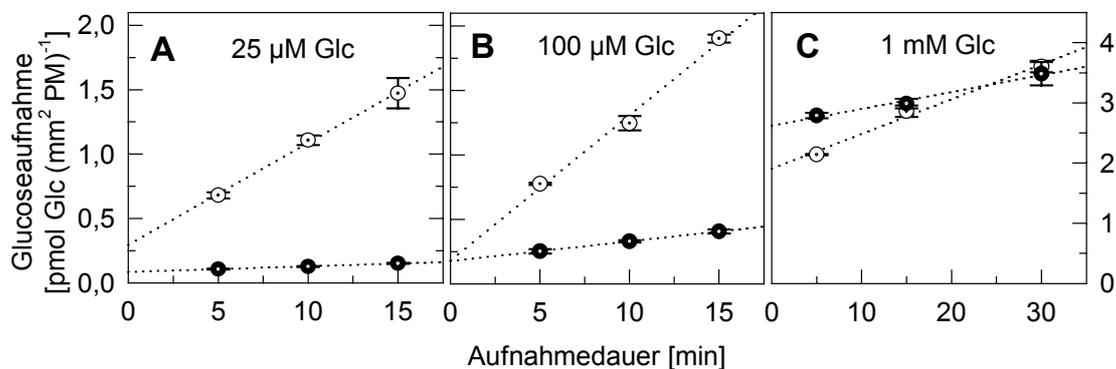


Abb. V.7. Linearität der ^{14}C -Glucoseaufnahme in Fraktionen nicht-infizierter (weiße Symbole) und infizierter (schwarze Symbole) Protoplasten bei $25\ \mu\text{M}$ (A), $100\ \mu\text{M}$ (B) und $1\ \text{mM}$ (C) Glucose. Werte sind Mittelwerte aus drei Proben \pm SE. Gepunktete Linien sind Regressionsgeraden.

Die Anzahl isolierbarer nicht-infizierter Protoplasten pro Experiment war durch die zeitaufwändige Gewebepreparation begrenzt (s. 4.2.3.2). Daher konnte die Glucoseaufnahme in Experimenten mit drei Messzeitpunkten und drei

Wiederholungen bei nur maximal vier Glucosekonzentrationen gemessen werden (Abb. V.8 grün, braun). Aufgrund der guten Linearität und geringen Streuung (Abb. V.7) wurde zur Erfassung einer detaillierten Kinetik die ^{14}C -Akkumulation bei nur zwei Messzeitpunkten (5, 10 min) und einer Wiederholung, aber 16-20 Konzentrationsschritten bestimmt (Abb. V.8 blau, rot).

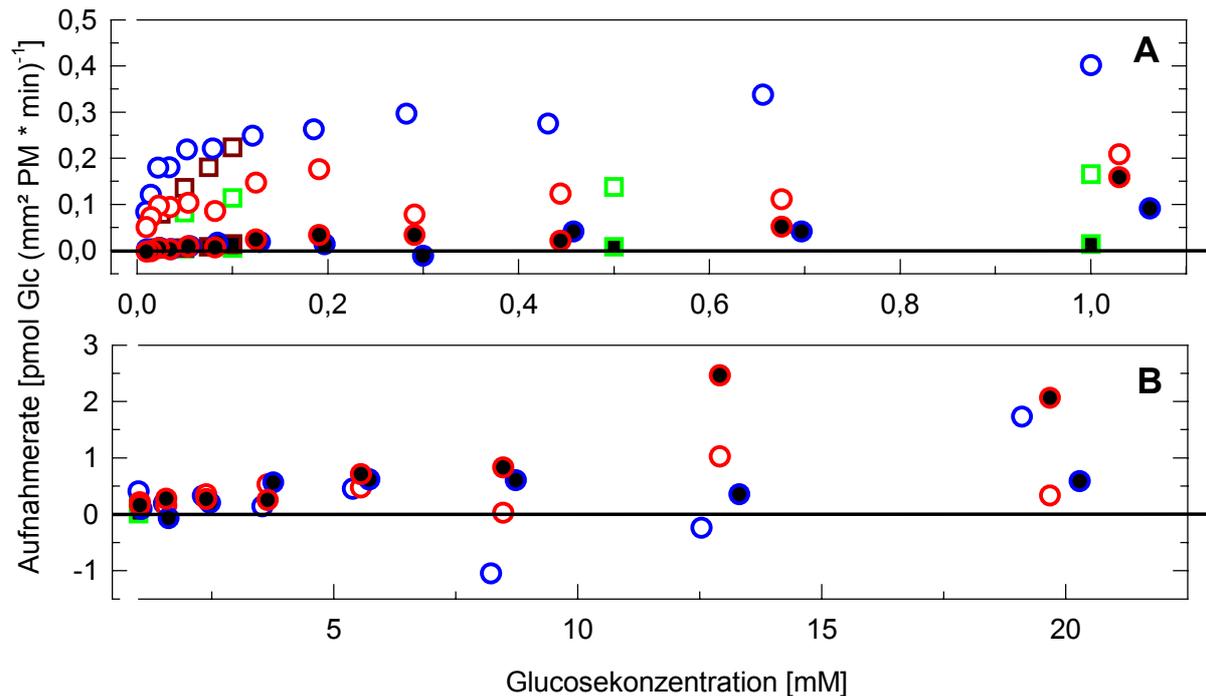


Abb. V.8. ^{14}C -Glucoseaufnahme durch Fraktionen nicht-infizierter (weiße Füllung) und infizierter (schwarze Füllung) Protoplasten bei 0-1 mM (A) und 1-20 mM (B) Glc im Medium. Unterschiedliche Farben der Symbolränder repräsentieren verschiedene, unabhängige Protoplastenisolationen. Aufnahmeraten wurden aus drei Parallelproben an drei Probenahmezeitpunkten (5, 10, 15 min; Quadrate) bzw. aus Einzelmessungen an zwei Probenahmezeitpunkten (5, 10 min; Kreise) errechnet.

In Aufnahmestudien mit niedrigen Glucosekonzentrationen ($< 1 \text{ mM}$) akkumulierten nicht-infizierte Protoplasten ^{14}C -Glucose, während infizierte Zellen keine eindeutige Aufnahme zeigten (Abb. V.8 A). Die Aufnahmeraten nicht-infizierter Protoplasten variierten beträchtlich zwischen verschiedenen

Experimenten (vgl. Abb. V.8 A, rot und blau). Eine Sättigungskinetik ist jedoch erkennbar. Mittels Lineweaver-Burk-Linearisierung wurden kinetische Daten der Aufnahme bei niedriger Glucosekonzentration ($< 1 \text{ mM}$) ermittelt (Abb. V.9). Obwohl aufgrund der starken Streuung keine exakten kinetischen Parameter ermittelt werden konnten, kann gesagt werden, dass nicht-infizierte Protoplasten Glucose bei niedrigen Konzentrationen hochaffin (k_m ca. 15-30 μM) aufnahmen.

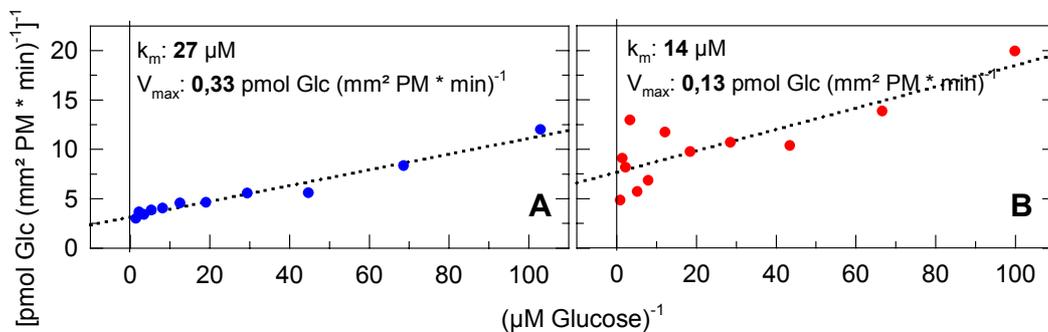


Abb. V.9. Lineweaver-Burk-Linearisierung der ^{14}C -Glucoseaufnahme durch nicht-infizierte Protoplasten aus Abb. V.8. **A** entspricht den blauen, **B** der roten Kurve in Abb. V.8 A. Für die Berechnung von k_m [μM] und V_{\max} [$\text{pmol Glucose (mm}^2 \text{ Plasmamembran} \cdot \text{min)}^{-1}$] wurden Aufnahmeraten bei Konzentrationen bis 1 mM Glucose herangezogen.

Bei höheren Konzentrationen ($> 1 \text{ mM}$) nahmen auch infizierte Protoplasten ^{14}C -Glucose auf, wobei sich die Aufnahmeraten beider Fraktionen in etwa entsprachen, aber extremen Schwankungen unterworfen waren (Abb. V.8 B).

Die Glucoseaufnahme durch infizierte und nicht-infizierte Protoplasten war durch Zusatz von 10 mM Glucose oder Saccharose zur Enzymsuspension (während Verdau) nicht stimulierbar (Abb. V.10).

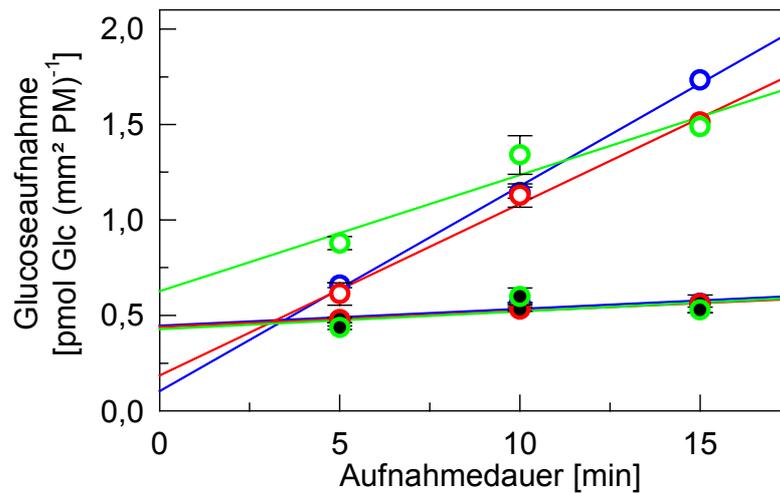


Abb. V.10. Einfluss von 10 mM Glucose (rot), 10 mM Saccharose (grün) und keinem Zucker (blau) in der Enzymsuspension der Protoplastenisolation auf die nachfolgende Akkumulation von ^{14}C -Glucose ($100\ \mu\text{M}$) durch Fraktionen nicht-infizierter (weiße Symbole) und infizierter (schwarze Symbole) Protoplasten. Werte sind Mittelwerte aus drei Parallelproben \pm SE. Durchgezogene Linien sind Regressionsgeraden.

Mechanismus der Glucoseaufnahme

Nicht-infizierte Protoplasten akkumulierten ^{14}C -Aktivität aus Glucose mehr als 10fach entgegen dem Aktivitätsgradienten (Abb. V.11). Bei niedrigen Glucosekonzentrationen lag nach 10 Minuten Aufnahmedauer das $^{14}\text{C}/^3\text{H}$ -Aktivitätsquotientenverhältnis nicht-infizierter Protoplasten zum Medium deutlich über eins (Abb. V.11). Bei infizierten Protoplasten überschritt dieses Verhältnis auch bei längerer Inkubation (bis 30 min) nie den Wert 0,6.

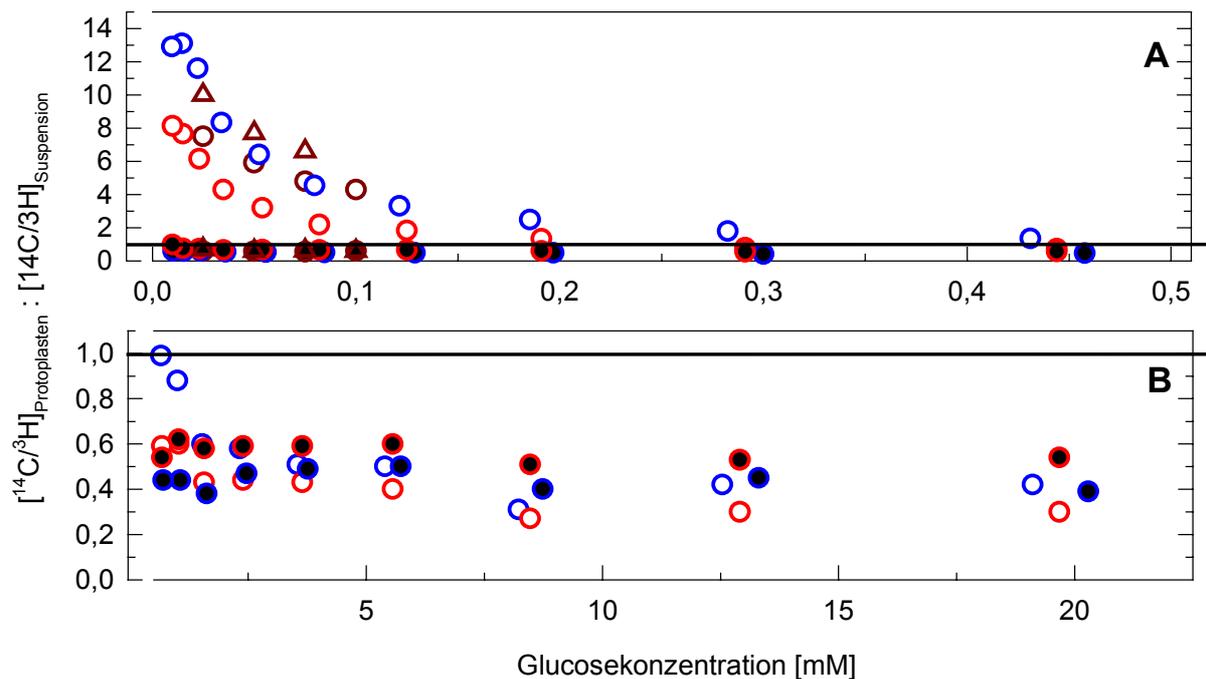


Abb. V.11. ^{14}C -Akkumulation in Protoplasten (Verhältnis der $^{14}\text{C}/^3\text{H}$ -Quotienten in Protoplasten und Medium) aus Abb. V.8 nach 10minütiger (Kreise) bzw. 15minütiger (Dreiecke) ^{14}C -Glucoseaufnahme durch Fraktionen nicht-infizierter (weiße Füllung) und infizierter Protoplasten (schwarze Füllung) bei 0-0,5 mM (A) bzw. 0,5-20 mM (B) Glucose im Medium. Farben der Symbolränder wie in Abb. V.8. Durchgezogene Linie zeigt gleiches $^{14}\text{C}/^3\text{H}$ -Verhältnis in Protoplasten und Medium (Quotient=1).

Mittels Inhibitoren und Stimulatoren wurde der Glucosetransport nicht-infizierter und infizierter Protoplasten bei niedriger Konzentration ($100\ \mu\text{M}$) näher charakterisiert (Tab. V.2). Der kompetitive Inhibitor Phlorizin zeigte keine eindeutige Wirkung, während der SH-Gruppen-Modifikator *N*-Ethylmaleimid (NEM) die Aufnahme um ca. 80% reduzierte. Die Glucoseaufnahme wurde durch das Protonophor CCCP stark gehemmt (80-90%) und durch den Stimulator der P-Typ H^+ -ATPase Fusicoccin gesteigert (160-350%). Die bei $100\ \mu\text{M}$ Glucose sehr geringen Aufnahmeraten infizierter Protoplasten wurden weder durch Phlorizin, NEM oder CCCP gehemmt, noch durch Fusicoccin stimuliert (Tab. V.2).

Tab. V.2. Einfluss von Effektoren auf die Aufnahme von ^{14}C -Glucose ($100\ \mu\text{M}$) durch Fraktionen nicht-infizierter und infizierter Protoplasten. Vier unabhängige Experimente.

Exp.	Messpunkte ^a	Wdh. ^b	Kontrolle abs. ^c	Phlo. ^d [%] ^h	NEM ^e [%]	CCCP ^f [%]	FC ^g [%]
nicht-infizierte Protoplasten							
A	3	3	0,113	- ⁱ	24	18	-
B	3	3	0,169	-	18	7	162
C	2	1	0,051	80	-	-	254
D	2	1	0,094	153	-	-	351
infizierte Protoplasten							
A	3	3	0,015	-	155	85	-
B	3	3	0,018	-	100	116	86
C	2	1	0,012	-	-	-	54
D	2	1	0,010	133	-	-	133

a. Probennahme nach 5, 10, 15 min bzw. 5, 10 min Aufnahmedauer; **b.** Wiederholungen je Messzeitpunkt; **c.** Aufnahme rate [pmol Glucose (mm^2 Plasmamembran \cdot min) $^{-1}$]; **d.** $250\ \mu\text{M}$ Phlorizin; **e.** $1\ \text{mM}$ *N*-Ethylmaleimid; **f.** $5\ \mu\text{M}$ Carbonylcyanid *m*-chlorophenylhydrazon; **g.** $5\ \mu\text{M}$ Fusicoccin; **h.** Prozent der Kontrolle; **i.** - = nicht bestimmt.

Spezifität der Glucoseaufnahme

Zur Überprüfung der Spezifität der ^{14}C -Glucoseaufnahme in nicht-infizierte Protoplasten wurde dem ^{14}C -Glucose-haltigen Aufnahmemedium eine zehnfach höhere Konzentration nicht radioaktiv markierten Zuckers (Kompetitor) zugegeben. Die Spezifität wurde in zwei Konzentrationsbereichen getestet. Die hochaffine Glucoseaufnahme ($100\ \mu\text{M}$) wurde durch Glucose ($1\ \text{mM}$) um 90% reduziert, jedoch nicht durch Fructose oder Saccharose (Tab. V.3 A). Im höheren Konzentrationsbereich traten die schon in den Kinetikstudien (5.3.2.4.1) beschriebenen starken Schwankungen auf (Tab. V.3 B). So führte die Konkurrenz der Aufnahme von $1\ \text{mM}$ Glucose mit

10 mM Glucose zu negativen Werten (d.h. ^{14}C -Glucosekonzentration bei erster Messung höher als bei zweiter). Fructose wirkte nicht eindeutig kompetitiv, während Saccharose die Glucoseaufnahme tendenziell reduzierte.

Tab. V.3. Konkurrenz verschiedener Zucker mit ^{14}C -Glucose um die Aufnahme durch Fraktionen nicht-infizierter Protoplasten. Zwei unabhängige Experimente mit jeweils zwei Wiederholungen. Die Aufnahmeraten wurden aus zwei Probenahmezeitpunkten errechnet (5, 10 min Aufnahmedauer).

Exp.	[Glc] mM	Komp.^a mM	Kontrolle abs.^b	Glucose [%]^c	Fructose [%]	Saccharose [%]
A	0,1	1	0,090 – 0,100	11 ^d 19	100 132	142 141
B	1	10	0,133- 0,145	# ^e #	62 101	26 86

a. Konzentration des Kompetitors (Glucose, Fructose oder Saccharose). **b.** Aufnahmeraten zweier Wiederholungen [$\text{pmol Glucose} (\text{mm}^2 \text{Plasmamembran} \cdot \text{min})^{-1}$]. **c.** Prozent des Mittelwertes der Kontrolle. **d.** zwei Wiederholungen. **e.** negative Absolutwerte, keine Aufnahme.

5.3.2.5 Saccharoseaufnahme durch sphärische infizierte und nicht-infizierte Protoplasten

Kinetik der Saccharoseaufnahme

Die Aufnahme von ^{14}C -Saccharose durch nicht-infizierte und infizierte Protoplasten wurde bei Konzentrationen zwischen 10 μM und 40 mM untersucht. Die Linearität der ^{14}C -Akkumulation wurde durch Probenahme zu drei Zeitpunkten (5, 10, 15 min) ermittelt (Abb. V.12). Bei hohen Saccharosekonzentrationen wurde in einigen Fällen eine leichte Abnahme der Aufnahme nach 15 min festgestellt, die zu einer Unterschätzung der Aufnahmeraten

nicht-infizierter Protoplasten führen kann. Die Parallelproben wiesen eine geringe Streuung auf.

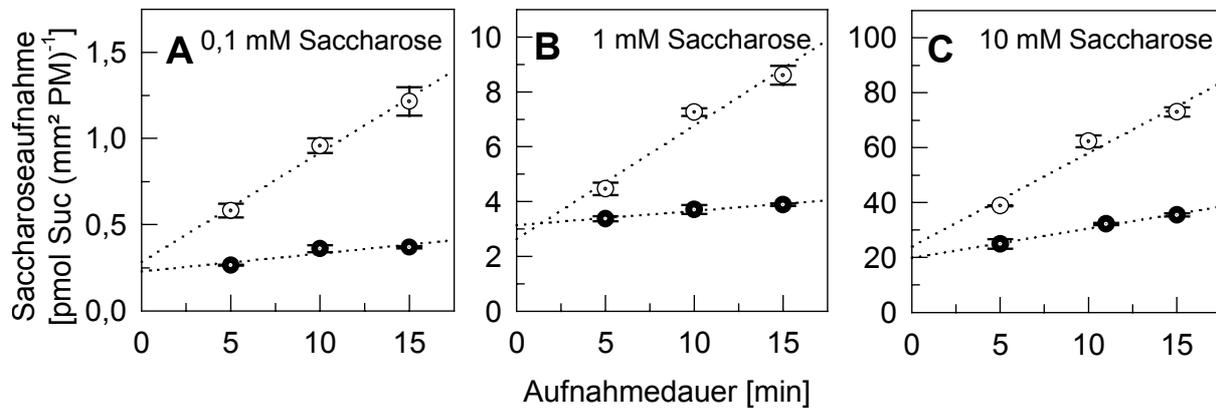


Abb. V.12. Linearität der ^{14}C -Saccharoseaufnahme durch Fraktionen nicht-infizierter (weiße Symbole) und infizierter (schwarze Symbole) Protoplasten bei 0,1 mM (A), 1 mM (B) und 10 mM (C) Saccharose. Werte sind Mittelwerte aus drei Proben \pm SE. Gepunktete Linien sind Regressionsgeraden.

Zur detaillierteren Untersuchung der Kinetik der ^{14}C -Saccharoseaufnahme wurde wie bei der Glucoseaufnahme (5.3.2.4) die ^{14}C -Akkumulation mit nur zwei Probenahmezeitpunkten (5, 10 min Aufnahme) und einer Wiederholung bestimmt. In einem Experiment konnte so die Aufnahme bei 20 Konzentrationsstufen untersucht werden (Abb. V.13).

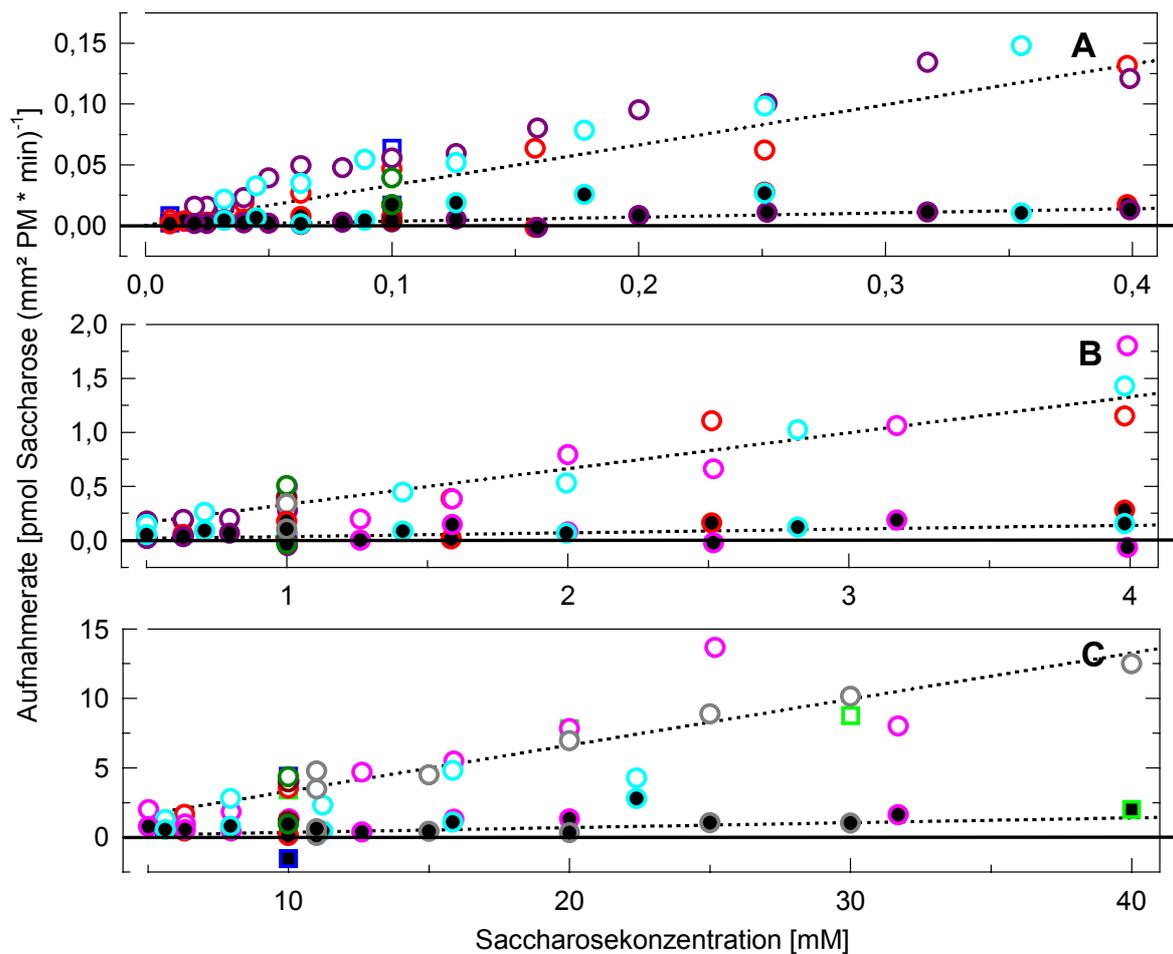


Abb. V.13. ^{14}C -Saccharoseaufnahme durch Fraktionen nicht-infizierter (weiße Füllung) und infizierter (schwarze Füllung) Protoplasten bei 0-0,4 mM (A), 0,4-4 mM (B) und 4-40 mM Saccharose (C) im Medium. Unterschiedliche Farben der Symbolränder repräsentieren verschiedene, unabhängige Protoplastenisolationen. Aufnahmeraten wurden aus drei Parallelproben an drei Probenahmezeitpunkten (5, 10, 15 min; Quadrate) bzw. aus Einzelmessungen an zwei Probenahmezeitpunkten (5, 10 min; Kreise) errechnet. Gepunktete Linien sind lineare Regressionsgeraden durch alle Werte der nicht-infizierten bzw. infizierten Fraktion.

Bei allen gemessenen Konzentrationen war die ^{14}C -Saccharoseaufnahmerate nicht-infizierter Protoplasten deutlich höher als die infizierter Protoplasten (Abb. V.13). Dabei war keine Sättigungskinetik erkennbar. Über alle Werte stieg die Saccharoseaufnahme mit der Saccharosekonzentration linear an ($r^2=0,92$).

Dieses Verhältnis lässt sich ausdrücken als:

$$y = 0,331 x \quad (4)$$

Dabei ist x die Saccharosekonzentration [mM] und y die Aufnahme rate [pmol Saccharose (mm^2 Plasmamembran \cdot min) $^{-1}$].

Die lineare Saccharoseaufnahme kinetik nicht-infizierter Protoplasten könnte ein lineares System oder eine Überlagerung mehrerer Transportsysteme mit nicht-linearer Kinetik darstellen. Nach Substraktion der linearen Komponente der Aufnahme ($y = 0,331 x$) von der Gesamtaufnahmerate verblieb eine zusätzliche, stark variable Transportaktivität im niedrigen Konzentrationsbereich (Abb. V.14), während in höheren Konzentrationsbereichen keine zusätzliche Aufnahme zu verzeichnen war (nicht gezeigt).

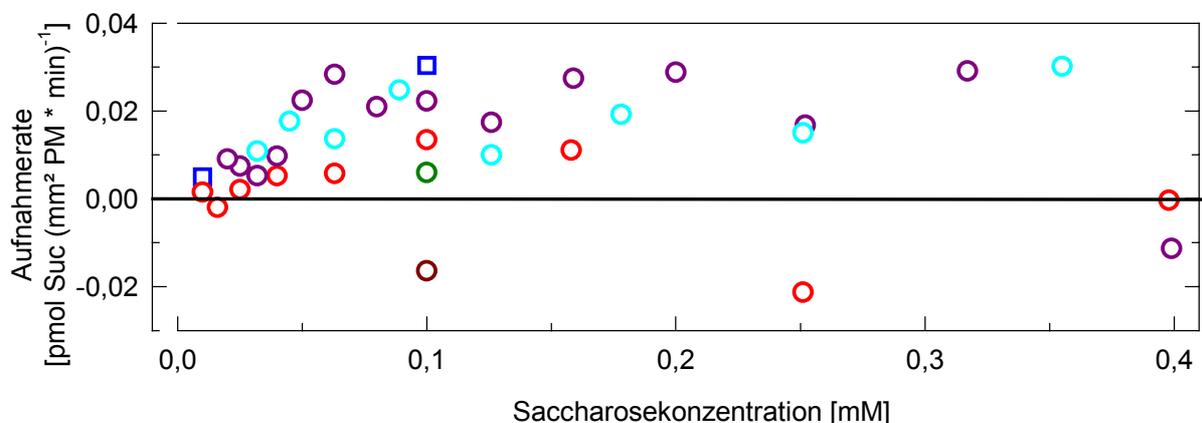


Abb. V.14. ^{14}C -Saccharoseaufnahme rate bis 0,5 mM durch Fraktionen nicht-infizierter Protoplasten aus Abb. V.13 nach Substraktion der linearen Aufnahme rate $y = 0,331 x$. Symbole wie in Abb. V.13.

Analyse dieser nicht-linearen Restaktivität (bis [Saccharose] < 250 μM) durch Linearisierung der Aufnahmekinetiken einzelner Experimente nach

Lineweaver-Burk ergab k_m -Werte zwischen 15 und 90 μM und V_{max} -Werte zwischen 0,017 bis 0,035 $\text{pmol Saccharose} (\text{mm}^2 \text{Plasmamembran} * \text{min})^{-1}$.

Im Gegensatz zum Verhalten nicht-infizierter Protoplasten war auch bei hohen Saccharosekonzentrationen (bis 40 mM) die Aufnahmeinfizierter Protoplasten extrem niedrig und nur sehr schwach konzentrationsabhängig. Dies wird durch die schwache Korrelation ($r^2=0,36$) der Regressionsgeraden über alle Werte (Abb. V.13) deutlich:

$$y = 0,035 x \quad (5)$$

Auch hier ist x die Saccharosekonzentration [mM] und y die Aufnahmeinfizierter Protoplasten [$\text{pmol Saccharose} (\text{mm}^2 \text{Plasmamembran} * \text{min})^{-1}$].

Mechanismus der Saccharoseaufnahme

Wie für die Glucoseaufnahme beschrieben (5.3.2.4), kann eine ^{14}C -Akkumulation entgegen dem Konzentrationsgradienten durch das Verhältnis der $^{14}\text{C}/^3\text{H}$ -Aktivitätsquotienten in Protoplasten und Medium ausgedrückt werden. Wiederum erhöhten nur nicht-infizierte Protoplasten dieses Verhältnis über eins, jedoch in geringerem Maße als bei der Glucoseaufnahme (Abb. V.15, Kreise). Anders als bei der Glucoseaufnahme stieg bei längerer Inkubation (15 min) das Akkumulationsverhältnis auch bei höheren Konzentrationen (bis 30 mM) über eins (Abb. V.15, Dreiecke). Bei infizierten Protoplasten betrug das Akkumulationsverhältnis wiederum maximal 0,6.

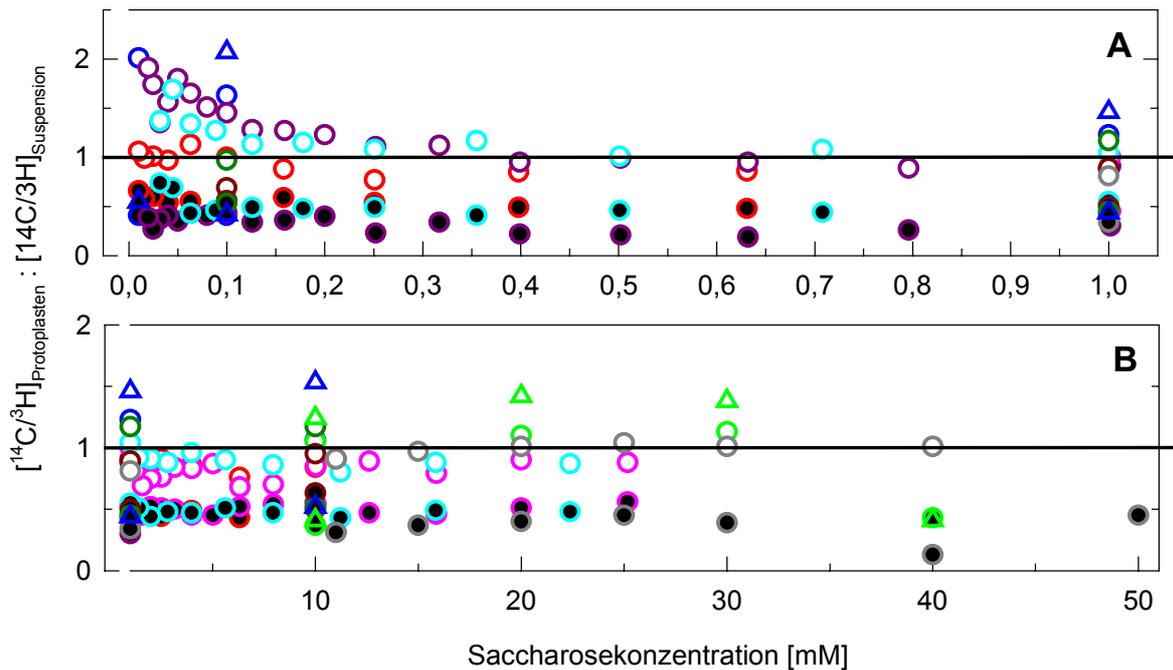


Abb. V.15. ^{14}C -Akkumulation in Protoplasten (Verhältnis der $[\text{C}/^3\text{H}]$ -Quotienten in Protoplasten und Medium) aus Abb. V.13 nach 10minütiger (Kreise) bzw. 15minütiger (Dreiecke) ^{14}C -Saccharoseaufnahme durch Fraktionen nicht-infizierter (weiße Füllung) und infizierter Protoplasten (schwarze Füllung) bei 0-1 mM (A) bzw. 1-50 mM (B) Glucose im Medium. Farben der Symbolränder wie in Abb. V.13. Durchgezogene Linie zeigt gleiches $^{14}\text{C}/^3\text{H}$ -Verhältnis in Protoplasten und Medium (Quotient=1).

Da bei der Saccharoseaufnahme nicht-infizierter Protoplasten mehrere unterschiedliche Transportsysteme beteiligt sein könnten (multiphasische Kinetik), wurde der Einfluss von Inhibitoren und Stimulatoren bei unterschiedlichen Saccharosekonzentrationen (0,1, 1, 10 mM) untersucht (Tab. V.4). Die Aufnahmeraten der Kontrollvarianten variierten stark zwischen den Experimenten. NEM und CCCP hemmten die Aufnahme bei allen Konzentrationsstufen sehr stark (>50%). Auch Phlorizin wirkte bei allen Konzentrationen hemmend, jedoch zeichnete sich eine Abhängigkeit des Hemmeffekts von der Aufnahmerate der Kontrolle ab. Fusicoccin stimulierte die Aufnahme von 0,1

mM Saccharose, jedoch nur bei niedriger Aufnahmerate der Kontrolle (Exp. A). Bei 1 mM und 10 mM Saccharose wirkte Fusicoccin nicht stimulierend.

Tab. V.4. Einfluss von Effektoren auf die Aufnahme von ^{14}C -Saccharose durch Fraktionen nicht-infizierter Protoplasten. Vier unabhängige Experimente. Die Aufnahmeraten wurden aus zwei Probenahmezeitpunkten errechnet (5, 10 min Aufnahmedauer).

Exp.	Kontrolle abs. ^a	Phlo. ^b [%] ^f	NEM ^c [%]	CCCP ^d [%]	FC ^e [%]
0,1 mM Saccharose					
A	0,0168	113	# ^g	#	218
B	0,0391	33	34	15	79
C	0,0249	- ^h	-	-	120
D	0,0618	-	-	-	115
1,0 mM Saccharose					
A	0,395	85	18	6	122
B	0,507	30	27	43	101
C	0,270	-	-	-	106
10 mM Saccharose					
A	3,97	57	37	23	91
B	4,35	29	27	48	125
C	4,10	-	-	-	78

a. Aufnahmerate [$\mu\text{mol Saccharose (mm}^2 \text{ Plasmamembran} \cdot \text{min)}^{-1}$]; **b.** 250 μM Phlorizin; **c.** 1 mM N-Ethylmaleimid; **d.** 5 μM Carbonylcyanid m-chlorophenylhydrazon; **e.** 5 μM Fusicoccin; **f.** Prozent von Kontrolle; **g.** negative Absolutwerte, keine Aufnahme; **h.** - = nicht bestimmt.

Spezifität der Saccharoseaufnahme

Der Effekt zehnfach höherer Konzentration nicht-radioaktiv markierter Zucker auf die Saccharoseaufnahme wurde bei 1 mM ^{14}C -Saccharose im Medium

getestet (Tab. V.5). 10 mM Saccharose hemmten die ^{14}C -Saccharoseaufnahme nicht, während 10 mM Glucose eine mehr oder weniger vollständige Hemmung des Saccharosetransports bewirkten.

Tab. V.5. Konkurrenz von Saccharose und Glucose mit ^{14}C -Saccharose um die Aufnahme durch nicht-infizierte Protoplasten. Einzelexperiment mit zwei Wiederholungen. Die Aufnahmeraten wurden aus zwei Probenahmezeitpunkten errechnet (5, 10 min Aufnahmedauer).

[Suc] mM	Komp. ^a mM	Kontrolle ^b (100%)	Saccharose [%] ^c	Glucose [%]
1	10	0,270 – 0,337	104 ^d 143	# ^e 17

a. Konzentration des Kompetitors (Saccharose oder Glucose) **b.** Aufnahmerate zweier Wiederholungen [$\mu\text{mol Saccharose (mm}^2 \text{ Membranoberfläche} \cdot \text{min)}^{-1}$]. Mittel = 100%. **c.** Prozent der Kontrolle. **d.** zwei Wiederholungen. **e.** negativer Absolutwert, keine Aufnahme.

Saccharosespaltung in Suspensionen infizierter und nicht-infizierter Protoplasten

Zur Fragestellung, ob in Protoplastensuspensionen Saccharose vor der Aufnahme gespalten wird, wurden nicht-infizierte und infizierte Protoplasten isoliert, separiert (4.2.3), mit unterschiedlichen Saccharosekonzentrationen inkubiert und mittels Phthalatzentrifugation vom Medium abgetrennt (5.2.5.1), in welchem daraufhin die Zuckerkonzentrationen enzymatisch bestimmt wurden (5.2.6).

In einer Suspension nicht-infizierter Protoplasten ohne Saccharoseaddition waren Spuren ($<10 \mu\text{M}$) von Glucose und Fructose vorhanden (Abb. V.16 A). Zugabe von $10 \mu\text{M}$ Saccharose führte zu keiner Steigerung der Monosaccha-

ridkonzentration, während 0,1 und 1 mM Saccharose im Medium die Glucosekonzentration, jedoch nicht die Fructosekonzentration, auf ca. 20 μM erhöhten (Abb. V.16 B-D). Die Zuckerkonzentrationen erhöhten sich während 30 Minuten Inkubationsdauer nicht.

Suspensionen infizierter Protoplasten enthielten auch in zuckerfreiem Medium ca. 20 μM Glucose, jedoch fast keine Fructose (Abb. V.16 A). Durch Zugabe von 0,1 und 1 mM Saccharose wurden Glucose- und Fructosekonzentrationen im Medium auf ca. 40 bzw. 20 μM erhöht (Abb. V.16 C, D). Auch in infizierten Fraktionen war kein deutlicher Anstieg der Zuckerkonzentrationen mit der Inkubationszeit messbar. Die Glucosekonzentration in Suspensionen infizierter Protoplasten lag immer deutlich über der von Fructose und überstieg diejenige nicht-infizierter Fraktionen (Abb. V.16 A-D).

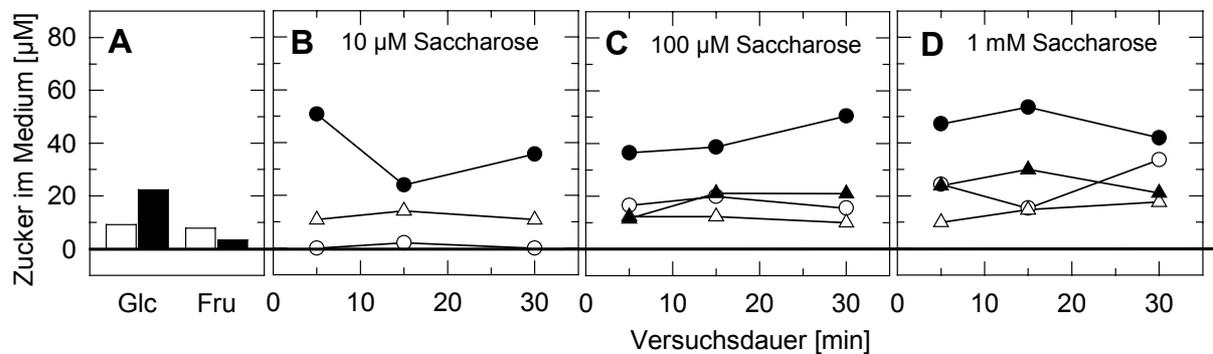


Abb. V.16. Einfluss von nicht-infizierten (weiß) und infizierten Protoplasten (schwarz) auf die Konzentrationen von Glucose (Kreise) und Fructose (Dreiecke) in zuckerfreiem Medium (A) und in Medien mit 10 μM (B), 100 μM (C) und 1 mM (D) Saccharose. Daten sind Mittelwerte der zweimal wiederholten enzymatischen Zuckerbestimmung. In infizierter Protoplastensuspension mit 10 μM Saccharose (B) war Fructose nicht nachweisbar.

5.3.2.6 Leucinaufnahme durch sphärische infizierte und nicht-infizierte Protoplasten

Kinetik der Leucinaufnahme

Zur Klärung der Frage, ob verschiedene Zelltypen des Zentralgewebes Aminosäuren aus dem Apoplasten aufnehmen können, wurden infizierte und nicht-infizierte Protoplasten mit $12 \mu\text{M} - 1,4 \text{ mM}$ ^{14}C -Leucin als Testaminosäure inkubiert. Infizierte Protoplasten zeigten keinerlei ^{14}C -Leucin-Akkumulation, während nicht-infizierte Protoplasten Leucin aufnahmen (Abb. V.17).

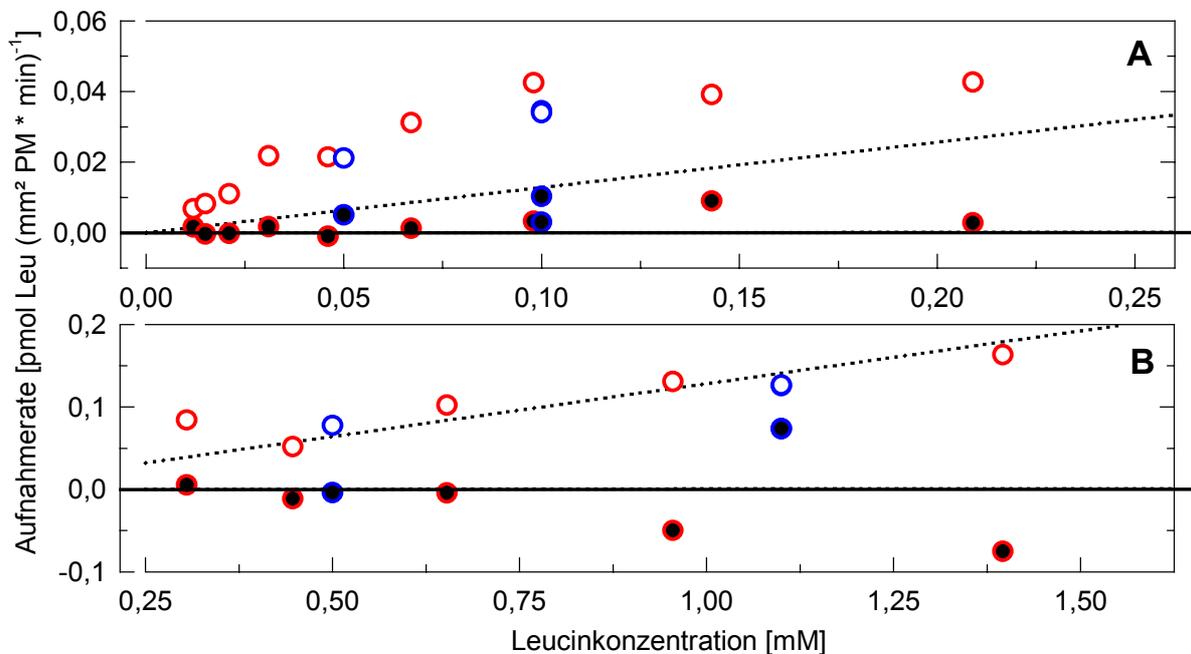


Abb. V.17. ^{14}C -Leucinaufnahme durch Fraktionen nicht-infizierter (weiße Füllung) und infizierter (schwarze Füllung) Protoplasten bei 0-0,25 mM (A) und 0,25-1,5 mM Leu (B) im Medium. Unterschiedliche Farben der Symbolränder repräsentieren verschiedene, unabhängige Protoplastenisolationen. Aufnahmeraten wurden aus Einzelmessungen an zwei Probenahmezeitpunkten (5, 10 min) errechnet. Gepunktete Linien sind lineare Regressionsgeraden durch alle Werte der nicht-infizierten bzw. infizierten Fraktion durch den Ursprung.

Die Leucinaufnahme nicht-infizierter Protoplasten war im niedrigen Konzentrationsbereich nicht-linear (Abb. V.17). Im höheren Konzentrationsbereich ($> 500 \mu\text{M}$) schloss sich ein linear konzentrationsabhängiger Anstieg der Aufnahme an ($r^2=0,94$), der sich ausdrücken lässt als:

$$y = 0,128 x \quad (6)$$

Dabei ist y die Aufnahme rate [$\text{pmol Leu} (\text{mm}^2 \text{Plasmamembran} * \text{min})^{-1}$] und x die Leucinkonzentration [mM].

Subtrahiert man die lineare Aufnahme von der Gesamtaufnahme, so erkennt man ein hochaffines sättigbares System (Abb. V.18). Mittels Lineweaver-Burk-Linearisierung dieser nichtlinearen Komponente ($< 300 \mu\text{M}$ Leucin) wurde ein k_m von $80 \mu\text{M}$ Leucin und ein V_{max} von $0,040 \text{ pmol Leu} (\text{mm}^2 \text{Plasmamembran} * \text{min})^{-1}$ berechnet.

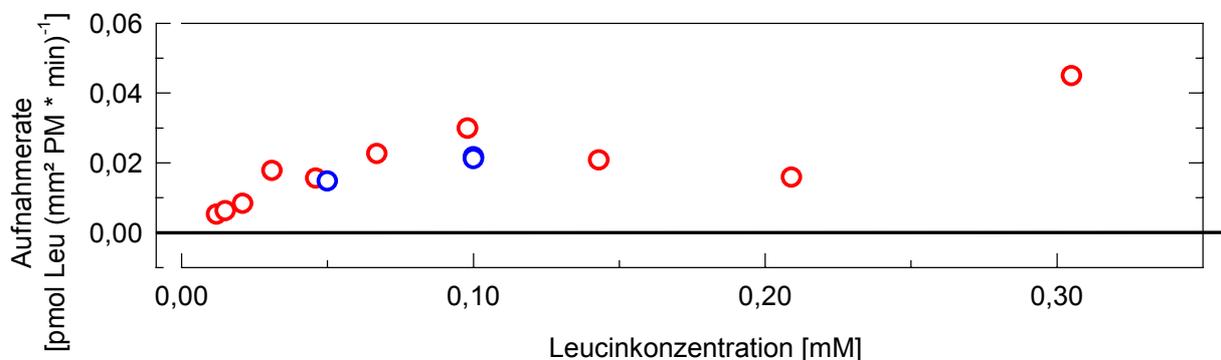


Abb. V.18. ^{14}C -Leucinaufnahmerate durch Fraktionen nicht-infizierter Protoplasten aus Abb. V.17 nach Subtraktion der linearen Aufnahme rate $y = 0,128 x$. Farben der Symbolränder wie in Abb. V.17.

Mechanismus der Leucinaufnahme

Die Berechnung des Verhältnisses der $[^{14}\text{C}/^3\text{H}]$ -Quotienten in Protoplasten und Medium (analog 5.3.2.4) zeigte, dass nur nicht-infizierte Protoplasten in

der Lage waren, ^{14}C aus Leucin entgegen dem Konzentrationsgradienten zu akkumulieren (Abb. V.19). Bei Leucinkonzentrationen unter $100\ \mu\text{M}$ im Medium wurde innerhalb 10 min das Konzentrationsgleichgewicht überschritten.

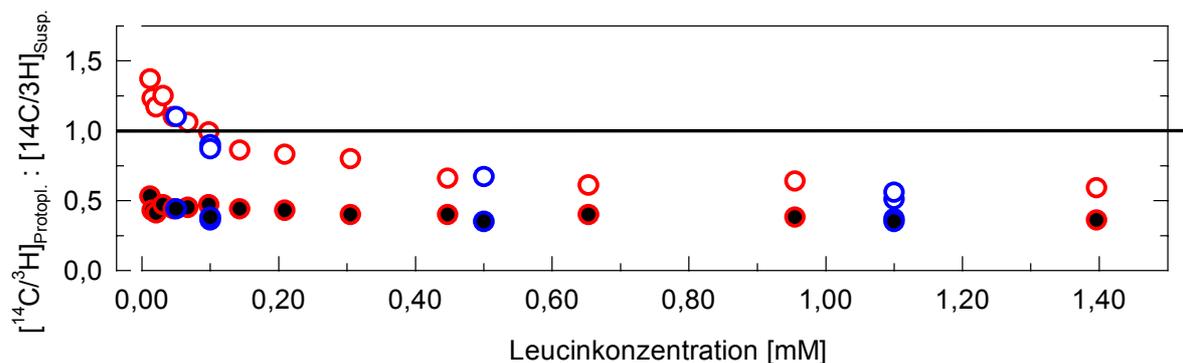


Abb. V.19. ^{14}C -Akkumulation in Protoplasten (Verhältnis der [$^{14}\text{C}/^3\text{H}$]-Quotienten in Protoplasten und Medium) aus Abb. V.17 nach 10minütiger ^{14}C -Leucinaufnahme durch Fraktionen nicht-infizierter (weiße Füllung) und infizierter Protoplasten (schwarze Füllung). Farben der Symbolränder wie in Abb. V.17. Durchgezogene Linie zeigt gleiches $^{14}\text{C}/^3\text{H}$ -Verhältnis in Protoplasten und Medium (Quotient=1).

Die Abhängigkeit der ^{14}C -Leucinaufnahme nicht-infizierter Protoplasten vom Protonengradienten der Plasmamembran wurde durch Zusatz von $5\ \mu\text{M}$ des Protonophors CCCP zum Inkubationsmedium mit $100\ \mu\text{M}$ Leucin getestet (analog 5.3.2.4). Die Aufnahmerate verringerte sich dadurch auf 22% des Kontrollwertes (Kontrolle: $0,0343\ \text{pmol Leu} [\text{mm}^2\ \text{Plasmamembran} \cdot \text{min}]^{-1}$).

Spezifität der Leucinaufnahme

Da es sich bei Leucin nicht um die primär aus dem Knöllchen exportierte Aminosäure handelt, wurde die Kompetitivität der Säureamide Asparagin (Asn) und Glutamin (Gln), sowie der sauren Aminosäuren Aspartat (Asp) und

Glutamat (Glu) untersucht (Tab. V.6). Die Aufnahme von 0,1 mM ^{14}C -Leucin wurde durch 1 mM Leucin zu knapp 70% gehemmt. Die Inhibierung des Transport durch Asn, Gln, Asp und Glu betrug indes nur ca. 30-40%.

Tab. V.6. Konkurrenz verschiedener Aminosäuren (1 mM) mit ^{14}C -Leucin (0,1 mM) um die Aufnahme durch nicht-infizierte Protoplasten. Einzelexperiment mit zwei Wiederholungen. Die Aufnahmezeiten wurden aus zwei Probenahmezeitpunkten errechnet (5, 10 min Aufnahmedauer).

Kontrolle	Leucin	Aspartat	Glutamat	Asparagin	Glutamin
abs. ^a	[%] ^b	[%]	[%]	[%]	[%]
0,0340 – 0,0345	33 ^c	78	62	42	64
	34	64	64	70	58

a. Aufnahmezeit zweier Wiederholungen [$\text{pmol Leu} (\text{mm}^2 \text{Plasmamembran} \cdot \text{min})^{-1}$]. **b.** Prozent vom Mittelwert der Kontrolle. **c.** zwei Wiederholungen.

5.4 Diskussion

Hauptziel dieses Teils der Arbeit war die Beurteilung eines apoplastischen Schrittes der Metabolitenbewegung zwischen Leitgewebe und infizierter Zelle. Die Möglichkeit (teil-) apoplastischer Export- und Importwege für Aminosäuren und Zucker wurde durch Exportstudien mit Zentralgewebe und Importstudien mit daraus isolierten Protoplasten untersucht. Messungen der Nettoprotonenabgabe dieser Versuchsobjekte zeigten die Aktivität einer zur Energetisierung sekundär aktiver Transportprozesse erforderlichen H^+ -ATPase.

5.4.1 Membranintegrität der Protoplastenfraktionen

Zur Durchführung von Transportstudien mit Protoplasten ist es essentiell, dass die Plasmamembran durch Homogenisationsvorgänge während des Aufnahmezeitraums nicht beschädigt wird. Die Veränderung der Membranintegrität während der Aufnahme kann durch Coinkubation der Protoplasten mit $^3\text{H}_2\text{O}$ und membranimpermeablem ^{14}C -Dextran verfolgt werden (Getz et al. 1987, Fieuw und Willenbrink 1991). Der Quotient des Aktivitätsverhältnisses von ^{14}C zu ^3H in Protoplasten und Medium ist dabei ein Maß für die Dextranverschleppung durch Zellen mit beschädigter Membran bzw. durch anhängendes Medium. In Testisolationen (Abb. V.4) und späteren Kontrollexperimenten war dieser Quotient bei nicht-infizierten Zellen und infizierten Zellen etwa gleich und änderte sich während des 22,5-minütigen Aufnahmezeitraums nicht. Lyse der Protoplasten durch Gefrieren oder Hitzebehandlung führte zur Angleichung der Dextrankonzentrationen von Protoplasten und Medium (Abb. V.4), was die Aussagekraft der Dextranmethode bezüglich Membranintaktheit bestätigt.

5.4.2 Nettoprotonenabgabe von Zentralgewebe und daraus isolierten infizierten und nicht-infizierten Protoplasten

Pflanzliche Zellen besitzen in ihrer Plasmamembran eine MgATP-getriebene H^+ -Pumpe, die ein elektrochemisches Potential aufbaut, das für sekundär aktive Transportprozesse genutzt werden kann (Mengel und Schubert 1985, Serrano 1990). Wird Gewebe in Medium inkubiert, kann die Aktivität der H^+ -ATPase eine Ansäuerung des als erweiterten Apoplasten fungierenden Mediums bewirken. Dies konnte hier bei Cortexgewebe und infiziertem Zentralgewebe von *V. faba*-Knöllchen beobachtet werden (Abb. V.1). Die H^+ -

Nettoabgabe durch infiziertes Gewebe war steigerbar durch Fusicoccin (Abb. V.1 C), einem spezifischem Stimulator der P-Typ H^+ -ATPase (Marré 1979) und hemmbar durch Vanadat (Abb. V.1 D), einem Inhibitor dieser ATPase. Die Vanadathemmbarkeit stieg mit der Inkubationsdauer (Abb. V.1 D), was auf Diffusionsprozesse durch Zellwände zurückzuführen sein könnte. Azid, ein Inhibitor der Atmungskette und der F_0F_1 -ATPase, hemmte die Nettoprotonenabgabe nur bei hoher Aktivität der Kontrolle (Abb. V.1 E, F), wahrscheinlich durch Limitierung der ATP-Versorgung.

Im Gegensatz zu anderen Geweben von *V. faba*, wie z.B. Blattgewebe (Delrot 1981), Wurzeln (Yan et al. 1992) oder Knöllchencortex (Abb. V.1 A), kehrte sich die Absenkung des Medien-pH-Wertes durch Knöllchen-Zentralgewebe oft in einen pH-Anstieg um (Abb. V.1). Dieser Effekt war mit dem gleichen Gewebe mehrmals reproduzierbar (Abb. V.1 B) und daher nicht durch defekte Membranen bedingt. Messung der Aminogruppenkonzentration im Medium zeigte, dass der pH-Anstieg durch eine Abgabe von Aminosäuren verursacht sein könnte, die eine Pufferwirkung besitzen (vgl. Abb. V.1 und V.2). In diesem Fall lägen im Knöllchen-Zentralgewebe zwei den apoplastischen pH-Wert gegenläufig bestimmende Prozesse vor, H^+ -ATPase-Aktivität und Aminosäurenabgabe. Der apoplastische pH-Wert des Zentralgewebes könnte durch die Aminosäurenabgabe über dem anderer Gewebe liegen. Dies würde die Aktivität von Prozessen beeinträchtigen, die den durch H^+ -ATPase-Aktivität aufgebauten elektrochemischen Gradienten ausnutzen (Bush 1993).

Der apoplastische pH-Wert des Knöllchen-Zentralgewebes wird durch Aktivität der H^+ -ATPasen verschiedener Zelltypen bestimmt, infizierter und nicht-infizierter. Aus diesem Grund wurde die Nettoprotonenabgabe infizierter und nicht-infizierter Zentralgewebeprotoplasten gemessen. Protoplasten beider Zelltypen gaben Protonen ins sie umgebende Medium ab (Abb. V.6). Osmotische Zerstörung der Protoplasten unterband die Ansäuerung des

Mediums. Sie wurde weiterhin durch Erythrosin B und fast vollständig durch Vanadat gehemmt. Dies sind Hinweise für eine H⁺-ATPase-vermittelte Protonenabgabe. Die Protonenabgabe nicht-infizierter Protoplasten wurde durch Fusicoccin stimuliert (Abb. V.6 C), wie dies auch bei Protoplasten aus anderen Geweben beobachtet wird (z.B. *Z. mays*-Wurzelprotoplasten, Lin 1980). Unerwarteterweise hatte Fusicoccin auf die H⁺-Nettoabgabe infizierter Protoplasten keinen Einfluss (Abb. V.6 D). Die Fusicoccin-Stimulation der H⁺-ATPase beruht auf der Stabilisierung des Komplexes eines phosphorylierten Threonins im C-Terminus des ATPase-Proteins mit einem 14-3-3-Protein (Maudoux et al. 2000). Bei Dephosphorylierung des Threonins bindet kein 14-3-3. Die Phosphorylierung der ATPase ist wiederum abhängig vom cytosolischen pH (Schaller und Sussman 1988). Damit könnte der fehlende Fusicoccineffekt auf die Nettoprotonenabgabe infizierter Protoplasten durch den Phosphorylierungsstatus des Proteins oder eine Fusicoccin-unabhängige stabile Bindung von 14-3-3 bedingt sein. Die unterschiedliche Stimulierbarkeit der Nettoprotonenabgabe infizierter und nicht-infizierter Protoplasten könnte daneben auf verschiedenen Isoenzymen in beiden Zelltypen beruhen. Dafür sprechen Ergebnisse von Campos et al. (1996), die bei *Phaseolus vulgaris* die plasmamembrangebundene H⁺-ATPase BHA1 nur in nicht-infizierten, jedoch nicht in infizierten Zellen des Knöllchen-Zentralgewebes lokalisieren konnten und über eine sehr entfernte ATPase-Isoform in infizierten Zellen spekulierten. Fedorova et al. (1999) hingegen gaben an, eine P-Typ-ATPase in infizierten und nicht-infizierten Zentralgewebezellen von *G. max* lokalisieren zu können, wobei die Immunomarkierung jedoch extrem schwach und mehr oder weniger homogen im Gewebe verteilt war.

In infizierten und nicht-infizierten Zellen scheinen damit verschiedene ATPase-Isoformen vorzuliegen, die unterschiedlich reguliert werden. Messungen mit Gewebe zeigten die kombinierten Eigenschaften der ATPasen beider Zelltypen.

5.4.3 Apoplastische Aminosäurebewegung im Knöllchen?

5.4.3.1 Freisetzung von Aminosäuren aus infiziertem Zentralgewebe

Im Fall eines apoplastischen Schrittes des Aminosäureexports aus infizierten Zellen ist eine Entladung über die Plasmamembran erforderlich. Diese Fragestellung wurde mit Gewebeinkubationsstudien bearbeitet. Mit Protoplasten wurden keine Exportexperimente durchgeführt, da der Zeitraum von der Knöllchensezierung bis zur Verfügbarkeit der Protoplastenfractionen mehrere Stunden betrug (4.2.3). Da in diesem Zeitraum keine N_2 -Fixierung stattfindet (die Nitrogenase wird durch atmosphärischen pO_2 inhibiert), wäre im Fall eines apoplastischen Exports der Vorrat exportierbarer Aminosäuren in Protoplasten wahrscheinlich vor Beginn des Experiments erschöpft.

Infiziertes Knöllchen-Zentralgewebe entließ über mehrere Stunden Aminoverbindungen in ein Inkubationsmedium (Abb. V.2). Dieses Verhalten wurde bislang nicht beschrieben. Streeter (1992) fand Ureide und Asn in apoplastischen Waschflüssigkeiten des äußeren Cortex von *G. max*-Knöllchen und schloss daraus auf einen apoplastischen Export. Es ist jedoch unwahrscheinlich, dass der äußere Cortex überhaupt an der Verlagerung fixierter N-Verbindungen beteiligt ist, da er vom Zentralgewebe durch die Knöllchenendodermis oder analoge Schichten apoplastisch isoliert ist (3.4.2.2).

Die Rate der Aminosäurenabgabe aus infiziertem Gewebe variierte sehr stark zwischen einzelnen Experimenten. Dies konnte nicht auf eine Tageszeitabhängigkeit zurückgeführt werden (Abb. V.3 A) und könnte bedingt sein durch Entwicklungs- bzw. Umweltabhängigkeit von Expression und Aktivität des Exportmechanismus. Alternativ sind jedoch auch andere Ursachen denkbar: (1) Eine höhere Abgaberate könnte durch eine höhere Aminosäurekonzentration im Cytosol ausgelöst werden, (2) vakuoläre Speicherproteine (4.4.4.4)

könnten unterschiedlich stark mobilisiert worden sein oder (3) das Aminosäuremuster im Cytosol könnte aufgrund modulierbarer Aktivitäten von z.B. GS, GOGAT, AAT oder AS (1.3.1.2) veränderlich sein und so den Export durch einen spezifischen Exporter beeinflussen. Es wurde eine höhere Abgaberate aus apikalem (jüngerem) als aus basalem (älterem) Gewebe gefunden (Abb. V.3 B), für die sowohl Veränderungen des Exportmechanismus, als auch von Muster und Konzentration cytosolischer Aminosäuren verantwortlich sein könnten. Die Muster abgegebener und cytosolischer Aminosäuren wurden nicht bestimmt.

Bei hohen Abgaberraten war der Export von Aminogruppen hemmbar durch Azid (Abb. V.2 E) und stimulierbar durch Fusicoccin (Abb. V.2 C), was für eine Abhängigkeit der Abgabe von Energiestatus und elektrochemischem Protonengradienten spricht. Bei niedrigen Abgaberraten war kein Effekt von Vanadat (Abb. V.2 D) oder Azid (Abb. V.2 F) vorhanden, was auf einen passiven Ausfluss hinweist. Damit waren möglicherweise zwei unterschiedliche Transportmechanismen vorhanden, ein passiver und ein energetisch abhängiger. Aufgrund der niedrigen Anzahl an Wiederholungen besitzen die Inhibitor- und Stimulatorergebnisse jedoch nur vorläufigen Charakter.

Der Mechanismus des Aminosäurenexports aus pflanzlichen Zellen ist größtenteils unklar. Der Transportvorgang wurde in der Schale sich entwickelnder Leguminosensamen intensiv untersucht (empty seed coat technique, de Jong und Wolswinkel 1995). In diesem System ist die Aminosäurenabgabe nicht CCCP-hemmbar (de Ruiter et al. 1984). Isolierte Samenschalen nehmen Aminosäuren mit linearer Kinetik auf (de Jong et al. 1997). Diese Ergebnisse sprechen für einen rein passiven Export durch eine in beiden Richtungen permeable, unselektive Pore, durch die auch Zucker gelangen (de Jong et al. 1997). Da in der vorliegenden Arbeit eine Aufnahme mit linearer Kinetik bei infizierten Protoplasten nicht beobachtet wurde (Abb.

V.17), ist die Präsenz einer unselektiven Pore in diesen Zellen unwahrscheinlich. Alternativ wäre ein Export durch entkoppelte Aktion von Importern denkbar, wie dies für den Zuckerexport vermutet wird (Delrot 2000). Bei infizierten Protoplasten des Zentralgewebes konnte jedoch kein Aminosäurenimport nachgewiesen werden (Abb. V.17). Infiziertes Gewebe könnte Aminosäuren alternativ durch einen gleichrichtenden Kanal in der Plasmamembran exportieren. Ein solcher spannungsabhängiger, aminosäureselektiver und für Zucker undurchlässiger Kanal (OEP16) wurde in der äußeren Chloroplastenmembran von *Pisum sativum* identifiziert (Pohlmeyer et al. 1997).

5.4.3.2 Aufnahme von Aminosäuren durch Zellen des Zentralgewebes

Infiziertes Zentralgewebe entließ Aminoverbindungen in ein Inkubationsmedium. Ein vollständiger apoplastischer Exportschritt *in vivo* würde deren Wiederaufnahme und Weiterleitung erfordern. In Übereinstimmung mit diesem Modell waren nicht-infizierte Protoplasten in der Lage, die Testaminosäure L-Leucin (L-Leu) aufzunehmen (Abb. V.17). Die Aufnahme wies eine biphasische Kinetik auf: Einer saturierbaren, hochaffinen (k_m 80 μ M) und durch das Protonophor CCCP hemmbaren Komponente (Abb. V.18) schloss sich ein linearer Anstieg an, der allerdings nur bis 1,4 mM untersucht wurde und den linearen Teil eines zweiten saturierbaren Systems darstellen könnte. Damit können Aminosäuren von nicht-infizierten Zellen durch H^+ -Cotransport aus dem Zentralgewebeapoplasten aufgenommen werden. Diese Zellen akkumulierten ^{14}C aus Leucin gegen den Aktivitätsgradienten (Abb. V.19), wobei jedoch unbekannt ist, welche Rolle die Leucinmetabolisierung (Transaminierung, Einbau in Peptide) dabei spielte.

Aminosäuren werden von pflanzlichen Geweben häufig mit multiphasischer Kinetik aufgenommen (Frommer et al. 1994). Despeghel und Delrot (1983) fanden bei Blättern von *V. faba* zwei saturierbare Phasen der Aufnahme, die beide CCCP-hemmbar waren. Pflanzliche Aminosäuretransporter sind meist nicht sehr spezifisch und transportieren ein breites Spektrum von Aminosäuren (Frommer et al. 1994). In vorliegender Arbeit wurde die Aufnahme der neutralen Aminosäure L-Leu sowohl durch saure Aminosäuren (L-Asp, L-Glu), als auch durch ihre Amide (L-Asn, L-Gln) gehemmt (Tab. V.6), was für eine Aufnahme durch einen Breitspektrumcarrier spricht.

Klonierung und heterologe Expression bestätigten die breite Spezifität der meisten Aminosäuretransporter (Fischer et al. 1998, Rentsch et al. 1998, Ortiz-Lopez et al. 2000). In *V. faba* wurden bisher sieben Teil- und Vollängenklone für Aminosäuretransporter identifiziert (*VfAAP 2, a, b, c*, Montamat et al. 1999; *VfAAP 1, 3, 4*, Miranda et al. 2001). *VfAAP 1* transportiert kein L-Asn und L-Asp, *VfAAP 3* kein L-Asn, L-Asp und L-Glu (Miranda et al. 2001). *VfAAP 2* besitzt eine sehr starke Präferenz für aromatische und neutrale aliphatische Aminosäuren, jedoch werden auch (in Reihenfolge ihrer Kompetitivität) L-Gln, L-Glu, L-Asn, L-Asp transportiert (Montamat et al. 1999). Auch nicht-infizierte Protoplasten des Knöllchen-Zentralgewebes bevorzugen neutrale Aminosäuren gegenüber sauren Aminosäuren und Amidien (Tab. V.6). Es ist daher möglich, dass diese Aminosäureaufnahme durch *VfAAP 2* geleistet wurde.

Pflanzliche Aminosäuretransporter werden sehr gewebespezifisch und entwicklungs kontrolliert exprimiert (Fischer et al. 1998, Ortiz-Lopez et al. 2000). Die Expression der Aminosäuretransporter aus *V. faba* wurde in Wurzel (*VfAAP 1, 3*), Stängel (*VfAAP 1, 2, 3, a*), Sinkblättern (*VfAAP 1, 2*), Sourceblättern (*VfAAP 2, c*), Hülsen (*VfAAP 1, 2, 3*), Blüten (*VfAAP a, b, c*) und Samen (*VfAAP 1, 3, 4, b*) nachgewiesen (Montamat et al. 1999, Miranda

et al. 2001). Expression von *VfAAP 4* konnte in keinem Organ gezeigt werden. Knöllchen wurden bisher jedoch nicht untersucht, so dass dieser Transporter eine knöllchenspezifische Isoform darstellen könnte. Neben einer gewissen Gewebespezifität ist auch eine Regulation durch Metabolite möglich. Die Expression von *VfAAP 1* wird durch Gln im Medium reprimiert (Miranda et al. 2001). Es ist daher möglich, dass die Expression des (der) Aminosäuretransporter nicht-infizierter Zellen des Zentralgewebes durch die Konzentration apoplastischer Aminosäuren reguliert wird.

Mit der unterschiedlichen Lokalisation und entwicklungsspezifischen Expression der Aminosäuretransporter unterscheiden sich auch deren Aufgaben. Sie sind unter anderem an der Proteinspeicherung oder der Phloembeladung nach Hydrolyse des Speicherproteins beteiligt. Ubiquitär exprimierte Transporter dienen der Wiederaufnahme auf der Transportstrecke ausgetretener Aminosäuren. Die in vorliegender Arbeit gefundene Aktivität von Aminosäuretransporter(n) in nicht-infizierten Zellen stellt wahrscheinlich einen Mechanismus zur Aufnahme von Aminosäuren aus der N_2 -Fixierung dar, die durch infizierte Zellen in den Apoplasten entlassen wurden. Dafür spricht auch, dass infizierte Protoplasten keine Aminosäuren aus dem Medium aufnahmen (Abb. V.17). Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen fanden Li und Day (1991) eine Aufnahme von Glu und Gln durch nicht-sphärische infizierte Protoplasten aus Knöllchen von *G. max*. Diese könnte zurückzuführen sein auf: (1) Unterschiede in der Aminosäuretranslokation indeterminierter und determinierter Knöllchen (1.4.1) oder (2) beschädigte Plasmamembranen dieser Protoplasten (4.4.1).

5.4.4 Apoplastische Zuckerbewegung im Knöllchen?

5.4.4.1 Aufnahme von Glucose durch Zellen des Zentralgewebes

Für einen apoplastischen Schritt des Zuckertransports zu infizierten Zellen wäre die Aktivität von Zuckertransportern in deren Plasmamembran erforderlich. Aufnahmestudien mit infizierten Protoplasten sprechen jedoch gegen einen solchen Schritt.

Infizierte Protoplasten nahmen bei niedrigen Konzentrationen fast keine Glucose aus dem Medium auf (Abb. V.8 A). Die sehr geringe Aufnahme war weder durch NEM oder CCCP hemmbar, noch durch Fusicoccin stimulierbar (Tab. V.2). Damit handelte es sich um passiven Influx, der wahrscheinlich nicht transportervermittelt war. Ein fehlender elektrochemischer Protonengradient über die Plasmamembran war wahrscheinlich nicht für die fehlende Aktivität eines Monosaccharidtransporters verantwortlich, da eine Nettoprotonenabgabe dieser Zellen messbar war (5.3.2.3).

Während Fraktionen sphärischer infizierter Protoplasten zumindest bei niedrigen Konzentrationen keine Glucose aufnahmen, wurde dies bei Fraktionen defekter, nicht-sphärischer infizierter Protoplasten beobachtet (Abb. V.5). Diese Glucoseaufnahme ist wahrscheinlich auf die Aktivität von Bacteroiden oder Symbiosomen in direktem Kontakt mit Medium zurückzuführen, da auch Symbiosome aus *Phaseolus vulgaris*-Knöllchen Glucose aufnahmen (Herrada et al. 1989) und die N₂-Fixierung isolierter Bacteroide aus *V. faba*-Knöllchen durch Glucose stimuliert wurde (Guérin et al. 1990).

Im Gegensatz zur intakten infizierten Fraktion akkumulierten nicht-infizierte Protoplasten Glucose aus dem Medium hochaffin (k_m : 15-30 μ M) und sättigbar (Abb. V.8). Die Glucoseaufnahme nicht-infizierter Protoplasten verlief über den Messzeitraum linear (Abb. V.7). Daraus ist ersichtlich, dass der Efflux während des Aufnahmezeitraums vernachlässigbar klein war und von Influx

gesprochen werden kann. Der Glucoseinflux war sensitiv gegenüber *N*-Ethylmaleimid (Tab. V.2), was auf die Beteiligung von Thiolgruppen am Transportvorgang deutet (Lemoine 2000). Er wurde durch das Protonophor CCCP stark gehemmt und durch Fusicoccin gesteigert (Tab. V.2). Dies weist auf eine Abhängigkeit des Glucosetransports vom elektrochemischen Protonengradienten der Plasmamembran, und damit auf einen H⁺-Glucose-Cotransport hin, der schon in früheren Arbeiten mit pflanzlichem Gewebe (Stanzel et al. 1988a) und Protoplasten (Lin et al. 1984a, Lin et al. 1984b, Getz et al. 1987, Fieuw und Willenbrink 1991, Ritte et al. 1999) verschiedener Arten gezeigt wurde.

Auf einen sekundär aktiven Influx von Glucose in intakte nicht-infizierte Protoplasten deutet auch die ¹⁴C-Akkumulation gegen den Aktivitätsgradienten (Abb. V.11). Diese Aufkonzentrierung könnte jedoch auch durch schnelle Metabolisierung oder Kompartimentierung aufgenommener Glucose und den dadurch erzeugten Konzentrationsgradienten verursacht werden. So lagen nach fünfminütiger Aufnahme von ¹⁴C-Glucose durch *Beta vulgaris*-Protoplasten nur noch 20% des aufgenommenen ¹⁴C in Glucose vor (Getz et al. 1987). Bei *Saccharum*-Protoplasten bewirkte eine hohe V_{\max} des vakuolären Zuckertransporters eine Kompartimentierung des aufgenommenen Zuckers in Vakuolen (Thom et al. 1982). Die Präsenz von Stärke in nicht-infizierten Protoplasten (Abb. IV.8) lässt weiterhin einen Einbau von ¹⁴C-Glucose in Stärke vermuten. Es ist unklar, inwiefern diese Prozesse zur ¹⁴C-Akkumulation nicht-infizierter Protoplasten beigetragen haben.

Bei höheren Konzentrationen wiesen infizierte und nicht-infizierte Protoplasten eine sehr stark variierende Glucoseaufnahme mit teilweise negativen Werten auf (Abb. V.8). Diese Variation war wahrscheinlich methodisch bedingt und beruhte auf einem zu geringen Anteil ¹⁴C-Glucose an der angebotenen Gesamtglucose, was in sehr niedrigen Aktivitäten (DPM) im Protoplastenpel-

let resultierte. Es ist daher nicht völlig auszuschliessen, dass infizierte Zellen einen niedrigaffinen Glucosetransporter besitzen, dessen Bedeutung jedoch von hohen apoplastischen Glucosekonzentrationen abhängig wäre.

Die Spezifität der Glucoseaufnahme wurde in vorliegender Arbeit durch Kompetitionsstudien mit 10fach höherer Konkretorkonzentration untersucht. Dieser Ansatz ist aufwändigeren vergleichenden Aufnahmestudien mit verschiedenen ^{14}C -markierten Metaboliten unterlegen, da (1) aufgrund der unterschiedlichen Konzentrationen von Testsubstanz und Konkretor verschiedene Transportsysteme involviert sein könnten und (2) die Testsubstanzaufnahme indirekt gehemmt werden könnte durch Aufnahme des Konkretors mittels eines weiteren sekundär aktiven Transportsystems, was zum Abbau des elektrochemischen Gradienten führen würde. Mit Fructose als Konkretor lag hier jedoch keiner der beiden Fälle vor, da die Glucoseaufnahme nicht-infizierter Protoplasten durch ein Angebot von Fructose nicht beeinflusst wurde (Tab. V.3). Dies stimmt mit der Beobachtung überein, dass pflanzliche Monosaccharidtransporter generell Glucose gegenüber Fructose bevorzugen (Fieuw und Willenbrink 1991, Ritte et al. 1999). In einigen Fällen wurde, wie hier (Tab. V.3), kein Einfluss von Fructose auf die Glucoseaufnahme gefunden (Getz et al. 1987). Saccharose hatte bei hoher, jedoch nicht bei niedriger Konzentration einen tendenziell hemmenden Effekt auf die Glucoseaufnahme (Tab. V.3). Ein direkt kompetitiver Effekt ist unwahrscheinlich, da pflanzliche Monosaccharidtransporter keine Disaccharide transportieren (Büttner und Sauer 2000). Die Hemmung der Glucoseaufnahme durch Saccharose könnte alternativ (1) auf einer Spaltung von Saccharose im Medium oder (2) auf dem oben erwähnten Abbau des elektrochemischen Gradienten durch sekundär aktive Saccharoseaufnahme beruhen. Letzteres ist wahrscheinlich, da die Aufnahme von ^{14}C -Saccharose durch das Protonophor CCCP gehemmt wurde (Tab. V.5), d.h. vom Protonengradienten abhängig war.

Eine Reihe pflanzlicher Monosaccharidtransporter wurde bisher molekular charakterisiert (Büttner und Sauer 2000). Aus *V. faba* wurde der Monosaccharidtransporter *VfSTP 1* isoliert, der in Cotyledonen, Hülsen, Wurzeln, Samenschale und Sinkblättern hoch exprimiert wird (Weber et al. 1997). Kinetik (k_m 30 μ M) und Spezifität (Glucose 20fach schneller aufgenommen als Fructose) dieses Transporters sprechen dafür, dass er auch für die Glucoseaufnahme in nicht-infizierte Zellen des Zentralgewebes verantwortlich sein könnte. Außer einer Monosaccharidtransportersequenz (*MsNOD800*) aus *Medicago sativa* (Jiménez-Zurdo et al. 2000) liegen bisher jedoch keine molekularen Daten über Zuckertransporter in Leguminosenknöllchen vor.

Expression und Aktivität pflanzlicher Monosaccharidtransporter ist gewebe-, entwicklungs- und umweltspezifisch (Williams et al. 2000) und kann vielfältig reguliert werden durch Transkription, mRNA-Stabilität und Translation des Transporters, sowie durch post-translationale Prozesse (z.B. durch Exocytose, Endocytose, Proteolyse, H^+ -ATPase, Lipidumgebung, Phosphorylierung, Redoxstatus, Protein-Proteininteraktionen) (Delrot 2000). Beispielsweise ist in *V.faba*-Cotyledonen die Expression von *VfSTP 1* auf Epidermiszellen über mitotisch aktivem Gewebe beschränkt, während in Speichergewebe Saccharosetransporter exprimiert werden (Weber et al. 1997). Die spezifische Aktivität eines hochaffinen Glucosetransporters in nicht-infizierten Zellen des Knöllchens könnte durch den Infektionsprozess gesteuert sein. Es ist denkbar, dass Rhizobien in einigen (später nicht-infizierten) Zellen der Invasionszone Mechanismen der Pathogenabwehr auslösen, während andere (später infizierte) Zellen eine Symbiose eingehen (1.2). Zellen, die eine Rhizobieninfektion erfolgreich abwehren, bleiben dann nicht-infiziert und besitzen Mechanismen der Pathogenabwehr, zu denen unter anderem die Induktion von Monosaccharidtransportern gehört (Truernit et al. 1996).

Die hohe Plastizität von Expression und Aktivität der Monosaccharidtransporter könnte eine Ursache sein für die starke Variation der Glucoseaufnahme nicht-infizierter Zellen (Abb. V.8). Da im Zentralgewebe des indetermierten Knöllchens alle Entwicklungsstadien nebeneinander vorliegen, unterliegen wahrscheinlich auch Expression und Aktivität des dort aktiven Glucosetransporters entwicklungsbedingten Veränderungen. Mit der neu entwickelten Isolationsmethode wurde eine Mischfraktion von Protoplasten aller Altersstufen (außer meristematischer und seneszenten Zone) gewonnen. Die gemessene Aufnahmeaktivität entspricht damit der Kombination verschiedener Fraktionen, deren Anteile nicht bekannt sind. Es ist ferner nicht völlig auszuschließen, dass auch durch Schritte der Isolationsmethode (Gewebepräparation, enzymatischer Verdau) die Expression eines Monosaccharidtransporters induziert wurde, da in *Arabidopsis* die Expression des Monosaccharidtransporters *AtSTP 4* durch Verwundung und Elicitoren induziert wird (Truernit et al. 1996). Dagegen spricht aber, dass in infizierten Zellen keine Transportaktivität vorhanden war (Abb. V.8).

In Abhängigkeit von Gewebe und Entwicklungsstadium erfüllen pflanzliche Monosaccharidtransporter unterschiedliche Aufgaben. In Sinks (z.B. entwickelnde Leguminosensamen) sind sie, parallel mit zellwandgebundenen Invertasen, an der Phloementladung beteiligt (Patrick 1997). In Sourcegewebe (z.B. Blattmesophyll) erfüllen sie die Funktion der Wiederaufnahme ausgetretener Zucker (Delrot 1981, Maynard und Lucas 1982b, Heineke et al. 1992). Auch bei dem in vorliegender Arbeit gefundenen Glucosetransporter nicht-infizierter Zellen handelt es sich wahrscheinlich um ein Wiederaufnahmesystem für in den Apoplasten entwichene Glucose.

5.4.4.2 Aufnahme von Saccharose durch Zellen des Zentralgewebes

Im getesteten Konzentrationsbereich (<40 mM) nahmen infizierte Protoplasten keine Saccharose aus dem Medium auf (Abb. V.13). Nicht-infizierte Protoplasten dagegen akkumulierten neben Glucose auch Saccharose. Die Aufnahmekinetiken unterschieden sich für beide Zucker jedoch deutlich. Die Saccharoseaufnahme zeigte bis zur höchsten angebotenen Konzentration keine Sättigung (Abb. V.13). Bei niedrigen Konzentrationen war eine zusätzliche, hochaffine Aufnahme vorhanden (Abb. V.14). Solche zwei- und mehrphasigen Aufnahmekinetiken mit linearer Komponente wurden bei der Saccharoseaufnahme verschiedenster pflanzlicher Systeme beobachtet (Maynard und Lucas 1982a, Maynard und Lucas 1982b, Lin et al. 1984b, Stanzel et al. 1988a, Stanzel et al. 1988b, Ritte et al. 1999), so auch bei Blattgewebe (Delrot 1981) und Cotyledonen (McDonald et al. 1996b) von *V. faba*. In allen Arbeiten wurde eine Aufnahme dann als linear bezeichnet, wenn keine Sättigung des Transporters bei der höchsten angebotenen Konzentration feststellbar war, die zwischen 20 mM (Ritte et al. 1999) und 200 mM (Maynard und Lucas 1982a) lag. Mit der in dieser Arbeit entwickelten Methode konnte nicht-infizierten Protoplasten eine maximale Saccharosekonzentration von 40 mM angeboten werden, da bei höheren Konzentrationen (d.h. höherer Dichte des Mediums) eine Trennung von Protoplasten und Medium nicht mehr möglich war. Es ist daher nicht auszuschließen, dass es sich bei der linearen Aufnahme von Saccharose in dieser und anderen Arbeiten um den pseudolinearen Teil der Aufnahmekinetik eines sättigbaren, niedrigaffinen Transporters handelt, der beispielsweise im Tonoplasten von *Hordeum vulgare* gezeigt wurde (Kaiser und Heber 1984).

Für die Beteiligung eines Membranproteins an der linearen Phase der Saccharoseaufnahme spricht die sehr starke Hemmbarkeit durch *N*-Ethylmaleimid (NEM; Tab. V.4). Auch in anderen pflanzlichen Systemen

hemmte NEM die lineare Phase der Saccharoseaufnahme (Maynard und Lucas 1982b, Stanzel et al. 1988b, McDonald et al. 1996b). Die Saccharoseaufnahme bei hoher Konzentration (10 mM) war außerdem durch CCCP hemmbar (Tab. V.4), was auf eine Abhängigkeit der linearen Phase von ΔpH und/oder $\Delta\psi$ hinweist. Im Unterschied zum hochaffinen Glucosetransport (Tab. V.2) war die lineare Phase der Saccharoseaufnahme bei hoher Konzentration nicht durch Fusicoccin stimulierbar (Tab. V.4). Gleiches Verhalten (CCCP-Effekt bei fehlendem Fusicoccineffekt) wurde auch bei einer niedrigaffinen Saccharoseaufnahme in *V. faba*-Cotyledonen beobachtet (McDonald et al. 1996a). Damit könnte in diesen Systemen entweder (1) ein Saccharose- H^+ -Symporter aktiv sein, für den der durch nicht-stimulierte H^+ -ATPase erzeugte Protonengradient nicht limitierend ist, oder (2) ein Uniport aktiv sein, der durch ΔpH oder $\Delta\psi$ reguliert wird. Auch bei Maynard und Lucas (1982b) war die lineare Komponente (bis 200 mM gemessen) pH- und energieabhängig und arbeitete gegen den Konzentrationsgradienten. In vorliegender Arbeit wurde ^{14}C aus Saccharose gegen den Aktivitätsgradienten akkumuliert (Abb. V.15), was aber, analog zur ^{14}C -Akkumulation aus Glucose (5.4.4.1), auf eine Metabolisierung oder Kompartimentierung aufgenommener Saccharose zurückzuführen sein könnte.

Aufgrund der linearen Kinetik wurde die Aufnahme von Saccharose (1 mM) durch eine zehnfach höhere Konzentration nicht kompetitiv gehemmt (Tab. V.5). Im Gegensatz dazu führten 10 mM Glucose zu einer fast kompletten Hemmung der Saccharoseaufnahme (Tab. V.5). Dies ist nicht auf eine kompetitive Hemmung zurückzuführen, da Saccharosetransporter keine Glucose transportieren (Bush 1993). Eine scheinbar kompetitive Hemmung der Aufnahme von Saccharose durch Glucose wird nur bei Geweben mit apoplastischer Invertaseaktivität gefunden (Stanzel et al. 1988a). Dabei täuscht die Aufnahme der Spaltprodukte Glucose und Fructose eine Saccharoseaufnahme vor. Protoplasten aus diesen Geweben zeigen die

glucosehemmbare Kinetik nicht mehr, da die Invertase mit der Zellwand entfernt wurde (Stanzel et al. 1988b). Die lineare Saccharoseaufnahme nicht-infizierter Protoplasten ist damit, trotz Glucosehemmbarkeit, nicht auf eine vorherige Spaltung der Saccharose durch extrazelluläre Invertasen zurückzuführen.

Auch aus geborstenen Protoplasten freigesetzte Enzyme könnten Saccharose im Medium spalten, was durch Inkubation von Protoplastensuspensionen untersucht wurde. Bei Angebot von 0,1 und 1 mM Saccharose zu nicht-infizierten Protoplasten waren zwar geringe Mengen von Monosacchariden im Medium vorhanden, diese stiegen jedoch innerhalb 30 min nicht an (Abb. V.16). Ferner überschritten die maximalen Aufnahmeraten von ^{14}C -Saccharose (Abb. V.13) die von ^{14}C -Glucose (Abb. V.8) bei weitem, und Saccharose hemmte die ^{14}C -Glucoseaufnahme, insbesondere bei niedrigen Konzentrationen, nicht (Tab. V.3). Diese Ergebnisse sprechen gegen die Beteiligung extrazellulärer Saccharosespaltung an der linearen Phase. Starke Hemmung der Aufnahme von ^{14}C -Saccharose durch Glucose trat auch bei *Pisum sativum*-Schließzellprotoplasten auf (Ritte et al. 1999). Wie in vorliegender Arbeit, sprachen auch dort mehrere Argumente gegen eine Spaltung der Saccharose vor der Aufnahme.

Der Mechanismus der Glucosehemmung des Saccharosetransports ist unklar. Die sofortige Hemmung schließt eine zuckerinduzierte Repression auf Transkriptions- und Translationslevel aus. Eine posttranslationale Regulation des Saccharosetransporters durch erhöhte Monosaccharidkonzentrationen im Cyotsol ist jedoch denkbar, z.B. durch Phosphorylierung (Delrot 2000). Dabei könnten Hexokinase (Jang und Sheen 1997) oder Membranproteine (Williams et al. 2000) die Rolle des Zuckersensors übernehmen, die Signalwege sind jedoch weitgehend unbekannt (Loreti et al. 2001). Sollte die lineare Saccharoseaufnahme durch einen Uniport vermittelt werden, könnte Glucose

außerdem durch kompetitive Hemmung cytosolischer Enzyme eine Akkumulation von Saccharose im Cytosol und damit einen Abbau des Konzentrationsgradienten bewirken.

Bei niedrigen Saccharosekonzentrationen schien neben der linearen Komponente ein zweites hochaffines System mit Sättigungskinetik (k_m nach Abzug der linearen Komponente: 15-90 μM) aktiv zu sein (Abb. V.14). Dieses System war immer durch CCCP und NEM hemmbar, jedoch nur bei niedriger Aktivität durch Fusicoccin stimulierbar (Tab. V.4). Es könnte sich daher um einen Saccharose- H^+ -Cotransport handeln, dessen Aktivität durch die Aktivität der H^+ -ATPase der Plasmamembran limitiert oder reguliert wird (Delrot 2000). Da dessen Transportraten niedriger waren als die des Glucosetransporters (vgl. Abb. V.14 und V.8) und die k_m -Werte der hochaffinen Glucose- und Saccharoseaufnahme in der gleichen Größenordnung lagen, ist nicht völlig auszuschließen, dass die hochaffine ^{14}C -Saccharoseaufnahme in Realität eine Aufnahme geringer Mengen ^{14}C -Glucose nach Spaltung durch freigesetzte saccharosespaltende Enzyme darstellt. Dagegen spricht jedoch, dass die Glucosekonzentration in Suspensionen nicht-infizierter Protoplasten bei Saccharosezugabe nicht anstieg (Abb. V.16).

Die Affinität (k_m) fast aller bisher klonierten und heterolog exprimierten Saccharosetransporter liegt im Bereich 0,3-1 mM (Williams et al. 2000) und ist damit niedriger als die der hochaffinen Komponente, aber wesentlich höher als die der linearen Komponente der Saccharoseaufnahme nicht-infizierter Zellen des Zentralgewebes. Ein relativ niedrigaffiner (k_m 11,5 mM) Saccharosetransporter (*AtSUT4*) wurde kürzlich aus *Arabidopsis* isoliert (Weise et al. 2000), jedoch sprechen auch dessen kinetische Daten nicht für eine Beteiligung an der linearen Phase der Aufnahme. Ein Kandidat für diese Aufnahmephase könnte ein saccharosebindendes Protein (SBP) sein, das aus *G. max* isoliert wurde (Rentsch et al. 1998).

Als Aufgaben der isolierten Saccharosetransporter werden Phloembeladung in Sourceblättern (z.B. DcSUT 1, Shakya und Sturm 1998), Wiederaufnahme von Saccharose entlang des Transportweges (z.B. DcSUT 2, Shakya und Sturm 1998; AtSUC 4, Weise et al. 2000) und Saccharoseaufnahme durch Sinkzellen (z.B. VfSUT 1, Weber et al. 1997) angesehen. In Schließzellen könnte die Saccharoseaufnahme der Erniedrigung des osmotischen Potentials zur Spaltöffnung dienen (Ritte et al. 1999). Die Aufgabe des bzw. der Saccharosetransporter in nicht-infizierten Zellen des Zentralgewebes besteht wahrscheinlich in einer Wiederaufnahme ausgetretener Saccharose. Auch eine Beteiligung an der Regulation der Gasdiffusion im Knöllchen durch Veränderung des osmotischen Potentials in Apoplast und Symplast (analog zum Schließzellmechanismus) ist denkbar (I.8).

6 Implikationen der Transportwege - Abschließende Bemerkungen

Das Ziel dieser Arbeit war, durch Integration mehrerer histologischer und physiologischer Ansätze ein klareres Gesamtbild über mögliche Transportwege für Metabolite im indeterminierten Leguminosenknöllchen und deren Implikationen für Metabolismus und Regulationsprozesse zu gewinnen. In Abb. VI.1 sind die nach den in dieser Arbeit gefundenen Ergebnissen zu erwartenden Stoffflüsse dargestellt, deren Besonderheiten im folgenden erläutert werden.

6.1 Transportwege für Metabolite im Knöllchen

Mit der N₂-Fixierung zusammenhängende Wasser- und Stoffflüsse spielen sich im von der Knöllchenendodermis umgebenen Innenraum ab. Der Ferntransport bewegt sich im von der vasculären Endodermis komplett eingeschlossenen Leitbündelsystem. Entwicklung und Ultrastruktur der vasculären Endodermis sprechen dafür, dass diese eine effektive Barriere des apoplastischen Flusses zu importierender und zu exportierender Verbindungen darstellt (Kapitel 3). Plasmodesmale Verbindungen können symplastische Stoffbewegungen zwischen vasculärer Endodermis und infizierter Zelle ermöglichen, wobei nicht-infizierte Zellen die Aufgabe von Leitbahnen übernehmen (Kapitel 3). Deren Funktion wäre damit analog der des paraveinalen Mesophylls in Blättern (z.B. von *G. max*), dessen Netzwerk den intercostalen Assimilattransport übernimmt (Franceschi und Giaquinta 1983).

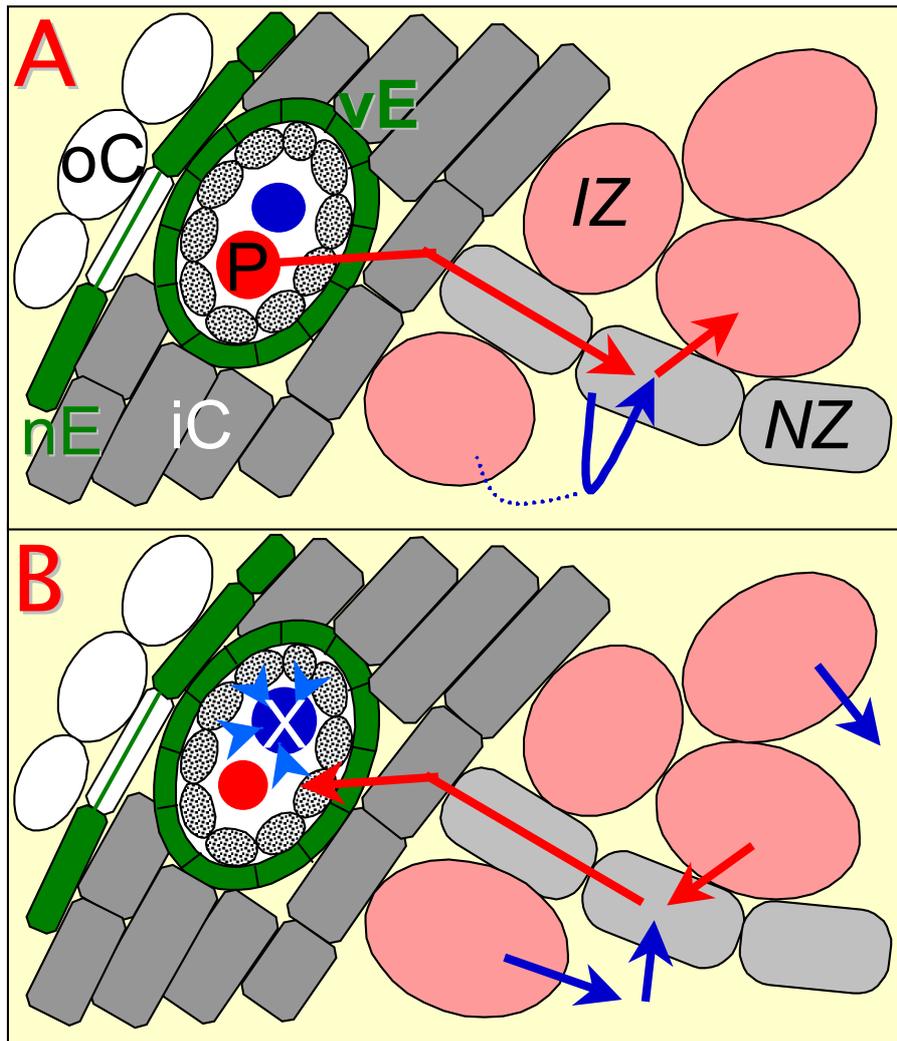


Abb. VI.1. Implikationen der Ergebnisse dieser Arbeit für symplastische (rot) und apoplastische (blau) Transportwege im von der Knöllchenendodermis (nE) eingeschlossenen Zentralgewebe von *V. faba*-Knöllchen. **A.** Import von Zuckern aus dem Phloem (P): Ein komplett apoplastischer Weg ist aufgrund der vasculären Endodermis (vE) nicht möglich. Symplastisch ist eine Bewegung von der vasculären Endodermis über inneren Cortex (iC) und nicht-infizierte Zellen (NZ) bis zu infizierten Zellen (IZ) möglich, die an nicht-infizierte angrenzen. Eine Zuckeraufnahme infizierter Zellen aus benachbarten infizierten Zellen oder aus dem Apoplasten ist unwahrscheinlich. Nicht-infizierte Zellen besitzen Transporter zur Wiederaufnahme von Zuckern. **B.** Export von Aminoverbindungen im Xylem (X): Infizierte Zellen könnten Aminosäuren in den Apoplasten oder in benachbarte nicht-infizierte Zellen entlassen. Nicht-infizierte Zellen nehmen Aminosäuren aus dem Apoplasten auf. Diese gelangen symplastisch via innerem Cortex und vasculärer Endodermis zu Transferzellen im Pericycel, die sie ins Xylem abgeben.

Für die Leitungs- und Sammelfunktion nicht-infizierter Zellen sprechen die gefundenen Transporter für Glucose, Saccharose und Aminosäuren (Kapitel 5), die wahrscheinlich der (Wieder-)aufnahme entlang der Leitbahnen dienen, wie dies auch im Phloem der Fall ist (Kühn et al. 1999). Auch innere Cortexzellen und Zellen der vasculären Endodermis (Kapitel 3) könnten Sammelfunktion besitzen, was nicht untersucht wurde.

Sollten nicht-infizierte Zellen des Zentralgewebes sowohl den Import, als auch den Export bewerkstelligen, so wären gegenläufige Stoffflüsse in deren Cytosol vorhanden. Dies stellt einen Transport durch interzellulären Massenfluss in Frage. Alternativ könnten symplastische Flüsse von Zuckern und Aminosäuren durch Diffusion entlang entgegengesetzter Gradienten angetrieben werden. Aufgrund des in mikroskopischen Schnitten gefundenen relativ geringen Anteils nicht-infizierter Zellen im Zentralgewebe (Abb. I.1) ist es unwahrscheinlich, dass alle infizierten Zellen symplastisch an nicht-infizierte angebunden sind (Kapitel 3).

6.2 Metabolitentransport und Metabolismus

Die Art der Einbindung infizierter Zellen in das symplastische Kontinuum nicht-infizierter Zellen bestimmt deren Versorgung mit C-Verbindungen und Entsorgung von N-Verbindungen. Die grundlegenden Prozesse des C- und N-Stoffwechsels wurden in Abschnitt 1.3 dargestellt. Symplastisch angebundene infizierte Zellen können Saccharose mittels Saccharosesynthase und/oder alkalischer Invertase spalten (1.3.2.1). Die Spaltprodukte können in die Stärkespeicherung oder in die Glycolyse eingehen. Durch PEP-Carboxylase werden Dicarboxylsäuren gebildet, die von Bacteroiden aufgenommen werden (1.4.2). Inwiefern andere C-Quellen (Glucose, Oxalat) von Bacteroiden

genutzt werden, ist nicht völlig klar (1.3.2.2). Viele Hinweise sprechen dafür, dass Prozesse des Saccharosekatabolismus in nicht-infizierten Zellen mit wesentlich höherer Intensität ablaufen, als in infizierten (1.3.2). Dies ist in Übereinstimmung mit der fehlenden Kompetenz infizierter Protoplasten zur Zuckeraufnahme (Kapitel 5). Die C-Versorgung infizierte Zellen ist damit wahrscheinlich von der Aktivität nicht-infizierter Zellen abhängig. Diese synthetisieren organische Anionen, die in den Zentralgewebeapoplasten entlassen werden könnten (Abb. VI.2). Eine Exsudation organischer Anionen bei erhöhter Aktivität von Saccharosesynthase und PEP-Carboxylase wird bei P-Mangel beobachtet (Neumann et al. 1999). Es gibt Hinweise, dass Parallelen der metabolischen Regulation bei P-Mangel und Hypoxie, wie sie im Zentralgewebe vorliegt, bestehen (Neumann et al. 2000). Von nicht-infizierten Zellen abgegebene Dicarboxylate können bei niedrigem apoplastischem pH-Wert undissoziiert ins Cytosol infizierter Zellen eindringen und dort dissoziieren (Anionenfalle). Für diesen Mechanismus wäre kein Transporter erforderlich.

Im Gegensatz zum C-Stoffwechsel deuten Expressionsmuster darauf hin, dass die NH_3 -Assimilation indeterminierter Knöllchen in infizierten Zellen abläuft (1.3.1.2). In Abhängigkeit von deren symplastischer Anbindung könnten Aminoverbindungen rein symplastisch zum Leitbündel gelangen oder in den Apoplasten entlassen werden (Abb. VI.3). Für letzteres sprechen die Abgabe von Aminoverbindungen durch infiziertes Gewebe und deren Aufnahme durch nicht-infizierte Protoplasten (Kapitel 5). Die aus Knöllchen hauptsächlich exportierte Verbindung ist Asn. Es ist unklar, ob das Muster exportierter Aminosäuren durch die Spezifität von Membrantransportern oder durch das Aminosäuremuster im Cytosol, d.h. durch die an der N-Assimilation beteiligten Enzyme (1.3.1.2), bestimmt wird.

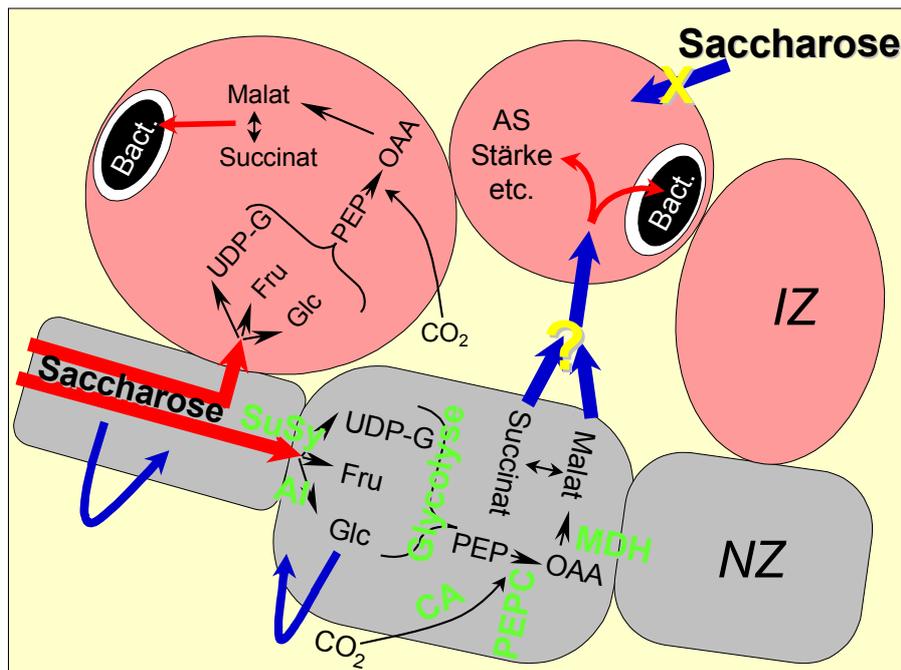


Abb. VI.2. Integration von gefundenen und hypothetischen Importvorgängen in metabolische Abläufe. Importierte Saccharose wird in nicht-infizierten Zellen mittels Saccharosylsucrase (SuSy) oder alkalischer Invertase (AI) gespalten. Aus der Glycolyse entstandenes Phosphoenolpyruvat (PEP) wird durch PEP-Carboxylase (PEPC) in Verbindung mit Carboanhydrase (CA) zu Oxalacetat (OAA) carboxyliert. Aus diesem bildet Malatdehydrogenase (MDH) Malat, das mit Succinat im Gleichgewicht steht. Dicarboxylate könnten in den Apoplasten entlassen und durch infizierte Zellen aufgenommen werden, wo sie für Bacteroidmetabolismus und andere Prozesse zur Verfügung ständen. Alternativ könnte Saccharose symplastisch in infizierte Zellen gelangen und durch die beschriebenen Prozesse metabolisiert werden.

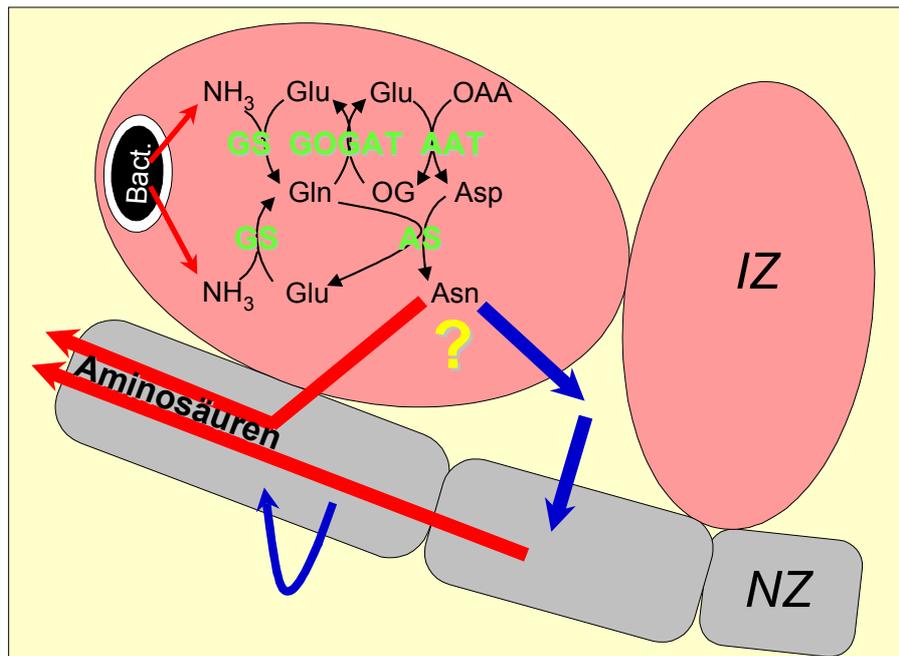


Abb. VI.3. Integration von gefundenen und hypothetischen Exportvorgängen in metabolische Abläufe. Aus der N₂-Fixierung entstandenes NH₃ wird durch Glutamin-Synthetase (GS) in Glu eingebaut, das durch Glutamat-Synthase (GOGAT) unter Einsatz von 2-Oxoglutarat (OG) wiederhergestellt wird. Aspartat-Aminotransferase (AAT) transaminiert Glutamat und Oxalacetat (OAA) zu OG und Asp. Dieses wird durch Asparagin-Synthetase zu Asn amidiert. Alle diese Prozesse laufen vornehmlich in der infizierten Zelle ab. Asn könnte symplastisch oder apoplastisch exportiert werden.

6.3 Metabolitentransport und Regulation der Knöllchenaktivität

In frühen Arbeiten wurde davon ausgegangen, dass die Nitrogenaseaktivität durch die Versorgung des Knöllchens mit Photoassimilaten limitiert wird (für Übersicht siehe Pate 1975). Gegen diese Hypothese spricht jedoch unter anderem, dass die Saccharosekonzentration im Knöllchen bei durch

Dürrestress gehemmter N_2 -Fixierung nicht abnimmt (Schubert et al. 1995) und eine teilweise Entblätterung des Sprosses die Saccharosekonzentration, nicht aber die Nitrogenaseaktivität im Knöllchen reduziert (Weisbach et al. 1996). Daher ist nicht davon auszugehen, dass der Saccharoseimport die N_2 -Fixierung limitiert, was in Übereinstimmung mit ^{11}C -Translokationsstudien ist (Walsh et al. 1998b).

Als alternative Hypothese wurde die Vorstellung entwickelt, dass die N_2 -Fixierung nicht C-, sondern O_2 -limitiert ist und durch eine variable Gasdiffusionsbarriere kontrolliert wird (für Übersicht siehe Hunt und Layzell 1993, Minchin 1997). Eine Vielzahl von Arbeiten zeigen, dass der Diffusionswiderstand dieser Barriere mit der Nitrogenaseaktivität und der atmosphärischen Sauerstoffkonzentration korreliert ist (z.B. Minchin et al. 1986, Witty et al. 1987). Eine Anpassung der Gasdiffusionsbarriere an den O_2 -Bedarf ist erforderlich, um eine irreversible Schädigung der O_2 -empfindlichen Nitrogenase zu verhindern (siehe 1.6). Gegen die Vorstellung, dass die Gasdiffusionsbarriere nicht nur einen Schutzmechanismus darstellt, sondern darüberhinaus die Nitrogenaseaktivität reguliert, spricht jedoch unter anderem, dass durch Dürre gehemmte Nitrogenaseaktivität durch erhöhte atmosphärische Sauerstoffkonzentration nicht vollständig wiederhergestellt werden kann (Serraj et al. 1999a).

Streeter (1993) stellte die Hypothese auf, dass die Verfügbarkeit von Wasser, das mit dem Phloemstrom und wahrscheinlich auch symplastisch aus dem Wurzelcortex ins Knöllchen gelangt (Streeter und Salminen 1992), den Export von N-Verbindungen limitiert. In vorliegender Arbeit wurden Zellwandeigenschaften gefunden, die einer Vermeidung von Wasserverlusten aus dem Knöllchen dienen (Kapitel 3): (1) Eine komplett mit Suberinlamellen versehene Knöllchenendodermis; (2) frühe Bildung von Suberinlamellen um dorsale Zellen der vasculären Endodermis; (3) Suberin und Triterpenoide im äußeren

Cortex. Eine Hemmung des Exports von Aminoverbindungen könnte daneben auch auf einer Regulation von Membrantransportprozessen beruhen. Beispielsweise wird die Expression des Aminosäuretransporters *VfAAP 1* durch Glutamin im Medium reprimiert (Miranda et al. 2001). Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten, dass ein apoplastischer Exportschritt im infizierten Gewebe wahrscheinlich ist (5.4.3), der eine solche Regulation des Exports ermöglichen würde. Gehemmter Export durch infizierte Zellen (5.4.3.1) bzw. gehemmte Wiederaufnahme durch nicht-infizierte Zellen (5.4.3.2) würde zunächst zur Akkumulation von Aminoverbindungen und/oder NH_3 führen, die wiederum eine kompetitive Inhibierung von N-Assimilation und/oder Nitrogenaseaktivität bewirken könnten (Schubert 1995).

Eine Reihe physiologischer Untersuchungen spricht gegen eine Hemmung des Exports von Aminoverbindungen bei erniedrigtem Bedarf des Sprosses. So ist bei gehemmter N_2 -Fixierung die Nitrogenaseaktivität meist nicht mit erhöhter Aminosäurenkonzentration im Knöllchen verbunden (z.B. Streeter 1987, Bacanamwo und Harper 1997), während diese im Spross gesteigert ist und die Pflanze keinen N-Mangel zeigt (z.B. bei Dürrestress, Plies-Balzer et al. 1995). Daher lag die Hypothese nahe, dass Konzentration und/oder Muster aus dem Spross ins Knöllchen rückverlagerter Aminosäuren das Signal für die N-Versorgung des Sprosses darstellen und regulierend auf die N_2 -Fixierung wirken (Parsons et al. 1993a; siehe 1.7). Ein unselektiver Import regulatorischer Aminosäuren in die infizierte Zelle wird ermöglicht durch symplastische Kontinuität mittels Plasmodesmen. In vorliegender Arbeit wurde gezeigt, dass diese Kontinuität über Bahnen nicht-infizierter Zellen besteht und sich daher zumindest an nicht-infizierte Zellen angrenzende infizierte Zellen in direktem symplastischem Kontakt zum Leitbündel befinden (3.4.3). Aminosäuren, die im Phloem in höherer Konzentration vorliegen als im infizierten Gewebe (z.B. Glutamin) könnten damit durch Diffusion an ihren Wirkort gelangen und dort Enzyme der N-Assimilation kompetitiv hemmen.

Die strukturellen und funktionellen Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen daher die Hypothese, dass aus dem Spross rückverlagerte Aminosäuren im infizierten Zentralgewebe des Knöllchens feedbackregulatorisch wirken können.

7 Zusammenfassung

Pflanzen der Ordnung Fabales (Leguminosae) sind durch Symbiose mit Rhizobien in der Lage, N_2 zu NH_3 zu reduzieren. Dazu bilden sie Wurzelknöllchen, in deren Zentralgewebe sich mit *Rhizobium*-Bacteroiden infizierte Zellen befinden. Das Zentralgewebe ist umschlossen von äußerem und innerem Cortex, in dem die Leitbündel eingebettet sind. Importierte und exportierte Metabolite müssen mehrere Zellschichten zwischen infizierter Zelle und Leitbündel überwinden. Es ist weitgehend unbekannt, ob dieser Transport auf symplastischem oder apoplastischem Weg erfolgt. Transportaktivitäten können jedoch in Kompartimentierung und Regulation der Knöllchenaktivitäten eingreifen. Ziel dieser Arbeit war es, mit verschiedenen Ansätzen mögliche Transportwege und -barrieren im indeterminierten, amidexportierenden Wurzelknöllchen von *Vicia faba* L. aufzuzeigen.

Die Entwicklung apoplastischer Barrieren im Knöllchencortex wurde anhand von Cryo-Serienschnitten licht- und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Dabei wurden zwei Grenzschichten charakterisiert:

1. Eine einlagige, zwischen äußerem und innerem Cortex vorhandene Knöllchenendodermis umschließt das Knöllchen zylindrisch und geht in die Wurzelendodermis über. Die Zellen der Knöllchenendodermis sind von Suberinlamellen umgeben, die mit Sudan Red 7B bereits in der submeristematischen Region nachweisbar sind. Nahe Leitbündeln sind nichtsuberinisierte Durchlasszellen vorhanden. Die Knöllchenendodermis besitzt Eigenschaften einer Barriere für Gase, Wasser und gelöste Stoffe.
2. Das Leitbündelsystem des Knöllchens ist in eine vasculäre Endodermis eingeschlossen, die einen Casparystreifen entwickelt, bevor lignifizierte Xylemelemente vorhanden sind. Zunächst bilden dorsale, später auch ventrale Zellen der vasculären Endodermis Suberinlamellen aus. Die

vasculäre Endodermis des Knöllchens stellt damit eine effektive Barriere für apoplastische Stoffflüsse dar.

Die unterschiedliche Entwicklung beider Barrierschichten konnte elektronenmikroskopisch bestätigt werden; Casparystreifen-typische Strukturen der vasculären Endodermis waren einer mit Lamellen versehenen Knöllchenendodermis benachbart.

Zwischen vasculärer Endodermis und infizierter Zelle könnten Metabolite apoplastisch oder symplastisch wandern. Ein apoplastischer Weg erfordert die Aktivität von Transportern in der Plasmamembran, was mittels Transportstudien an Protoplasten untersucht werden sollte. Mit herkömmlichen Methoden isolierte infizierte Protoplasten waren nicht sphärisch, nicht osmotisch aktiv und besaßen keine intakte Plasmamembran. Es wurde ein neues Protokoll zur Isolation und Trennung von osmotisch aktiven infizierten und nicht-infizierten Protoplasten entwickelt. Dieses beruhte im wesentlichen auf: a. einer Dissektion des Zentralgewebes vom Cortex vor dem Verdau; b. einem nichtschüttelnden Zellwandverdau in hypertonem Medium; c. einer Freisetzung der Protoplasten durch osmotische Expansion in leicht hypotones Medium und d. einer Trennung infizierter und nicht-infizierter Protoplasten in einem diskontinuierlichen Ficollgradienten. Durch Ausschluss von Propidiumjodid wurde die Intaktheit der Plasmamembran dieser Fraktionen bestätigt. Der verbreitete Fluorescein-Diacetat-Test war bei infizierten Zellen nicht anwendbar, da vitale Bacterioide in defekten Zellen vorhanden waren. Die licht- und elektronenmikroskopische Untersuchung infizierter Protoplasten zeigte einige Besonderheiten dieser Zellen:

1. Das Cytoplasma zerfließt nicht bei mechanischer Beschädigung der Zelle. In hypotonem Medium expandieren periphere Symbiosome und perforieren die Plasmamembran.
2. Mitochondrien liegen geclustert in der Peripherie, wie dies auch im intakten Knöllchen der Fall ist. Mit ihnen assoziiert sind Amyloplasten. Lugolfärbun-

gen zeigten, dass physiologisch alte infizierte Protoplasten keine Stärke mehr enthielten.

3. Die Vakuolen enthalten Speicherprotein und von Doppelmembranen umgebene Einschlüsse. Negative Neutralrotfärbung deutete auf einen nicht-sauren pH-Wert dieser Vakuolen.
4. Bacteroide enthielten größere Mengen Polyhydroxybutyrat. Dies ist ungewöhnlich für Rhizobien indeterminierter Knöllchen.

Die Entwicklung dieses Protokolls ermöglichte erstmals Transportstudien mit Zentralgewebeprotoplasten. Zentralgewebe und daraus isolierte nicht-infizierte und infizierte Protoplasten gaben Protonen ins Medium ab. Die Nettoprotonenabgabe aus Zentralgewebe war hemmbar durch Azid und Vanadat und stimulierbar durch Fusicoccin. Sie kehrte sich oft in eine Nettoaufnahme um, die wahrscheinlich durch Abgabe von Aminverbindungen ausgelöst wurde. Dies könnte den apoplastischen pH-Wert des Zentralgewebes beeinflussen. Infizierte und nicht-infizierte Protoplasten zeigten eine Nettoprotonenabgabe, die durch Vanadat und Erythrosin B hemmbar, aber nur bei nicht-infizierten Zellen durch Fusicoccin stimulierbar war. Damit ist die Möglichkeit eines H^+ -Cotransports in beiden Zelltypen gegeben. Die Aufnahme ^{14}C -markierter Metabolite wurde durch eine Phthalatzentrifugationstechnik ermittelt. Der Ausschluss von ^{14}C -Dextran zeigte, dass die Protoplasten während des Aufnahmezeitraums nicht lysierten. Aufnahmestudien mit Glucose, Saccharose und Leucin führten zu folgenden Ergebnissen:

1. Glucose wurde von nicht-infizierten Zellen hochaffin durch NEM-hemmbareren H^+ -Symport aufgenommen. Die Aufnahme war nicht durch Fructose oder Saccharose hemmbar. Infizierte Zellen nahmen im niedrigen Konzentrationsbereich (<1 mM) keine Glucose auf. Bei hohen Konzentrationen (bis 20 mM) zeigten infizierte und nicht-infizierte Protoplasten eine sehr stark schwankende Aufnahme, die auf methodische Probleme zurückgeführt wurde.

2. Saccharose wurde im Konzentrationsbereich 10 μ M - 40 mM durch nicht-infizierte Protoplasten mit linearer Kinetik aufgenommen, die durch eine hochaffine Komponente überlagert wurde. Die Aufnahme war bei 0,1, 1 und 10 mM Saccharose NEM- und CCCP-hemmbar. Fusicoccin stimulierte nur bei 0,1 mM und nur bei niedriger Aufnahmerate der Kontrolle. Glucose hemmte die Saccharoseaufnahme fast vollständig. Dies war nicht auf eine Spaltung der Saccharose im Medium zurückzuführen, da Saccharose wesentlich schneller aufgenommen wurde als Glucose und die Glucosekonzentration in einer saccharosehaltigen Protoplastensuspension nicht anstieg.
3. Nicht-infizierte Protoplasten nahmen Leucin mit biphasischer Kinetik auf. Einer nicht-linearen hochaffinen Phase schloss sich eine lineare Komponente an (bis 1,4 mM gemessen). Die Aufnahme war CCCP-hemmbar. Asn, Gln, Asp und Glu kompetitierten schwächer als Leu um die Aufnahme.

Glucose, Saccharose und Leucin wurden durch nicht-infizierte Zellen gegen den Aktivitätsgradienten akkumuliert. Infizierte Zellen nahmen Saccharose und Leucin nicht auf. Der apoplastische Export von Aminosäuren wurde durch Inkubation von Zentralgewebe untersucht. Dieses gab Aminosäuren über einen längeren Zeitraum ins Medium ab. Die Abgaberate variierte stark zwischen einzelnen Experimenten. Sie war Fusicoccin-stimulierbar und teilweise Azid-hemmbar.

Die gefundenen Ergebnisse sprechen für eine Sammel- und Leitungsfunktion nicht-infizierter Zellen des Knöllchen-Zentralgewebes. Infizierte Zellen werden entweder symplastisch versorgt oder könnten von nicht-infizierten Zellen abgegebene Metabolite (Dicarboxylate) aus dem Apoplasten aufnehmen. Aminosäuren könnten von infizierten Zellen symplastisch abgegeben oder in den Apoplasten entlassen werden. Die Implikationen der gefundenen Transportprozesse für Knöllchenfunktion und -regulation werden diskutiert.

8 Anhang

8 1 Bezugsquellen für Chemikalien

Soweit vorhanden, werden die deutschen Lieferadressen für die in 2.1.1, 2.2.1, 3.2.1, 4.2.1 und 5.2.1 gelisteten Chemikalien genannt.

Aldrich	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Seelze, Germany
APB	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg, Germany
biotrend	Biotrend Chemikalien GmbH, Köln, Germany
Calbiochem	Calbiochem-Novabiochem GmbH, Bad Soden, Germany
Difco	Difco Laboratories, Detroit, USA
Fluka	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Seelze, Germany
Merck	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt, Germany
Microm	Microm International GmbH, Walldorf, Germany
MP	Molecular Probes Europe BV, Leiden, NL
Packard	Canberra-Packard GmbH, Dreieich, Germany
Plano	W. Plannet GmbH, Wetzlar, Germany
Schmidt	Fa. Schmidt, Dillenburg, Germany
Seishin	Seishin Co., Tokyo, Japan
Serva	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Germany
Sigma	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Seelze, Germany
RdH	(Riedel-de Haen) Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Seelze, Germany
Roche	r-biopharm, Darmstadt, Germany
Yakult	Yakult Pharmaceutical Ind. Co., Tokyo, Japan

8.2 Aus dieser Arbeit entstandene Veröffentlichungen

8.2.1 Artikel in begutachteten Zeitschriften

Hartmann K, **Peiter E**, Koch K, Schubert S, Schreiber L (2002). Chemical composition and ultrastructure of broad bean (*Vicia faba* L.) nodule endodermis in comparison to the root endodermis. *Planta* **215**, 14-25.

Abd-Alla MH, Koyro H-W, Yan F, Schubert S, **Peiter E** (2000). Functional structure of the indeterminate *Vicia faba* L. root nodule: Implications for metabolite transport. *Journal of Plant Physiology* **157**, 335-343.

8.2.2 Artikel in Kongressbänden

Peiter E, Yan F, Schubert S (2001). Metabolite transport in indeterminate *Vicia faba* L. nodules: Structural and functional studies. *In*: W.J. Horst *et al.* (editors). Plant Nutrition: Food security and sustainability of agro-ecosystems through basic and applied research. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, NL. ISBN 0-7923-7105-4. pp. 652-653.

Peiter E, Abd-Alla MH, Schubert S (1999). Structure of the *Vicia faba* root nodule: implications for metabolite transport. *In*: J. Heyes, C. Offler, J. Patrick, M. Thorpe (editors). International Conference on Assimilate Transport and Partitioning. Lloyd Scott Enterprises, Hamilton NSW, Australia. ISSN 0-7259-10690. p. 226.

Peiter E, Imani J, Yan F, Schubert S (1999). Protoplasts from legume root nodules: A promising tool for the study of metabolite transport. *In*: J. Heyes, C. Offler, J. Patrick, M. Thorpe (editors). International Conference on Assimilate Transport and Partitioning. Lloyd Scott Enterprises, Hamilton NSW, Australia. ISSN 0-7259-10690. p. 224.

Peiter E, Imani J, Yan F, Schubert S (1999). Legume root nodule protoplasts – handle with care. *In: Der Präsident der Justus-Liebig-Universität Gießen* (editor). 5th Werkstattbericht aus Natur- und Lebensmittelwissenschaften. Justus-Liebig-Universität, Gießen, Germany. ISBN 3-931866-12-2. p. 267.

Peiter E, Imani J, Yan F, Schubert S (1999). Legume root nodule protoplasts – handle with care. *In: Der Präsident der Justus-Liebig-Universität Gießen* (editor). 1st IFZ workshop. Justus-Liebig-Universität, Gießen, Germany. ISBN 3-931866-11-4. p. 35.

8.2.3 Posterpräsentationen

Peiter E, Yan F, Schubert S (2001). In and out: Metabolite movement within indeterminate legume nodules.

Presented at:

- XIV International Plant Nutrition Colloquium, 27 July 2001 - 03 August 2001, Hannover, Germany. *1st prize at poster awards.*
- 5th symposium of the DFG priority program “The apoplast of higher plants: Compartment for storage, transport, and reaction”, 13-15 September 2001, Berlin, Germany.
- Society of Experimental Biology Plant Transport Group meeting, 18-20 September 2002, York, UK.

Peiter E, Hartmann K, Schreiber L, Schubert S (2000). Apoplastic barriers in the cortex of the *Vicia faba* root nodule: Development, ultrastructure, and chemistry.

Presented at:

- Annual Meeting of the German Society of Plant Nutrition, 03-05 September 2000, Giessen, Germany.

- 5th symposium of the DFG priority program “The apoplast of higher plants: Compartment for storage, transport, and reaction”, 13-15 September 2001, Berlin, Germany.

Peiter E, Imani J, Yan F, Schubert S (2000). Legume root nodule protoplasts: New approaches for isolation, separation, and characterization.

Presented at:

- Annual Meeting of the German Society of Plant Nutrition, 03-05 September 2000, Giessen, Germany. *1st prize at poster awards.*

Peiter E, Imani J, Yan F, Schubert S (1999). Protoplasts from legume root nodules: A promising tool for the study of metabolite transport.

Presented at:

- International Conference on Assimilate and Partitioning. 15-20 August 1999, Newcastle, NSW, Australia.
- 4th symposium of the DFG priority program “The apoplast of higher plants: Compartment for storage, transport, and reaction”, 11-13 November 1999, Bonn, Germany.

Peiter E, Abd-Alla MH, Schubert S (1999). Structure of the *Vicia faba* root nodule: implications for metabolite transport.

Presented at:

- International Conference on Assimilate and Partitioning. 15-20 August 1999, Newcastle, NSW, Australia.
- 4th symposium of the DFG priority program “The apoplast of higher plants: Compartment for storage, transport, and reaction”, 11-13 November 1999, Bonn, Germany.

Peiter E, Imani J, Yan F, Schubert S (1998). Legume root nodule protoplasts – handle with care.

Presented at:

- 3rd symposium of the DFG priority program “The apoplast of higher plants: Compartment for storage, transport and reaction”, 12-14 November 1998, Würzburg, Germany.
- 1st Interdisciplinary Research Center workshop, 04 June 1999, Gießen, Germany.
- 5th “Werkstattbericht aus Natur- und Lebensmittelwissenschaften”, 09-10 July 1999, Gießen, Germany.

Abd-Alla MH, **Peiter E**, Yan F, Schubert S (1998). Ultrastructure and functioning of the transport system in the root nodule of *Vicia faba*.

Presented at:

- 3rd symposium of the DFG priority program “The apoplast of higher plants: Compartment for storage, transport and reaction”, 12-14 November 1998, Würzburg, Germany.

8.2.4 Vorträge bei Kolloquien und Konferenzen

Peiter E (2002). In and out: Metabolite movement within indeterminate legume nodules.

Presented at: Society of Experimental Biology Plant Transport Group meeting, 18-20 September 2002, York, UK.

Peiter E (2002). Know the way? Metabolite transport pathways in indeterminate legume nodules.

Presented at: Interdisciplinary seminar »Ecology in the soil-plant system«, Institute of Soil Science and Plant Nutrition, Martin Luther University of Halle-Wittenberg, 28 June 2002, Halle / Saale, Germany.

Peiter E (2002). A long way to go - pathways of metabolite transport in indeterminate legume nodules.

Presented at: Colloquium of the Institute of Crop Production and Grassland Research, University of Hohenheim, 15 January 2002, Stuttgart-Hohenheim, Germany.

Peiter E (2001). The apoplast of legume nodules as transport compartment for amino acids, amides, and sugars.

Presented at: Colloquium of the Institute of Plant Nutrition, JLU Giessen, 17 December 2001, Giessen, Germany.

Peiter E (2001). Metabolitentransport im indeterminierten Leguminosen-knöllchen: Struktur- und Funktionsuntersuchungen zur Bedeutung des Apoplasten. [Metabolite transport in the indeterminate legume nodule: structural and functional studies on the importance of the apoplast.]

Presented at: 5th symposium of the DFG priority program "The apoplast of higher plants: Compartment for storage, transport, and reaction", 13-15 September 2001, Berlin, Germany.

Peiter E (1999). The apoplast of legume nodules as a transport compartment for amino acids, amides, and sugars.

Presented at: 4th symposium of the DFG priority program "The apoplast of higher plants: Compartment for storage, transport, and reaction", 11-13 November 1999, Bonn, Germany.

9 Literatur

- Abd-Alla MH, Koyro H-W, Yan F, Schubert S, Peiter E (2000). Functional structure of the indeterminate *Vicia faba* L. root nodule: implications for metabolite transport. *J. Plant Physiol.* **157**, 335-343.
- Almeida JPF, Hartwig UA, Frehner M, Nösberger J, Luscher A (2000). Evidence that P deficiency induces N feedback regulation of symbiotic N₂ fixation in white clover (*Trifolium repens* L.). *J. Exp. Bot.* **51**, 1289-1297.
- Andersen RA, Sowers JA (1968). Optimum conditions for bonding of plant phenols to insoluble polyvinylpyrrolidone. *Phytochemistry* **7**, 293-301.
- Appleby CA (1984). Leghemoglobin and *Rhizobium* respiration. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **35**, 443-478.
- Armstrong W, Cousins D, Armstrong J, Turner DW, Beckett PM (2000). Oxygen distribution in wetland plant roots and permeability barriers to gas-exchange with the rhizosphere: a microelectrode and modelling study with *Phragmites australis*. *Ann. Bot.* **86**, 687-703.
- Arrese-Igor C, Royuela M, De Lorenzo C, De Felipe MR, Aparicio-Tejo PM (1993). Effect of low rhizosphere oxygen on growth, nitrogen fixation and nodule morphology in lucerne. *Physiol. Plant.* **89**, 55-63.
- Bacanamwo M, Harper JE (1997). The feedback mechanism of nitrate inhibition of nitrogenase activity in soybean may involve asparagine and/or products of its metabolism. *Physiol. Plant.* **100**, 371-377.
- Becher M, Schepl U, Schubert S (1997). N₂ fixation during different physiological stages of *Phaseolus vulgaris* OAC Rico and its supernodulating mutant R32BS15: The role of assimilate supply to and export from nodules. *J. Plant Physiol.* **150**, 31-36.

- Bergersen FJ (1997). Physiological and biochemical aspects of nitrogen fixation by bacteroids in soybean nodule cells. *Soil Biol. Biochem.* **29**, 875-880.
- Bergersen FJ, Turner GL (1975). Leghemoglobin and the supply of O₂ to nitrogen-fixing root nodule bacteroids: Studies of an experimental system with no gas phase. *J. Gen. Microbiol.* **89**, 31-47.
- Blumenthal JM, Russelle MP, Vance CP (1997). Nitrogenase activity is affected by reduced partial pressures of N₂ and NO₃⁻. *Plant Physiol.* **114**, 1405-1412.
- Broughton WJ, Wooi KC, Hoh CH (1976). Acetylene reduction by legume root nodule protoplasts. *Nature* **262**, 208-209.
- Brown MM, Hall JL, Ho LC (1997). Sugar uptake by protoplasts isolated from tomato fruit tissues during various stages of fruit growth. *Physiol. Plant.* **101**, 533-539.
- Brown SM, Chudek JA, Hunter G, Sprent JI, Walsh KB, Wurtz G (1997). Proton density and apoplastic domains within soybean nodules in relation to the oxygen diffusion barrier. *Plant Cell Environ.* **20**, 1019-1029.
- Brown SM, Oparka KJ, Sprent JI, Walsh KB (1995). Symplastic transport in soybean root nodules. *Soil Biol. Biochem.* **27**, 387-399.
- Brown SM, Walsh KB (1994). Anatomy of the legume nodule cortex with respect to nodule permeability. *Aust. J. Plant Physiol.* **21**, 49-68.
- Brown SM, Walsh KB (1996). Anatomy of the legume nodule cortex: Species survey of suberisation and intercellular glycoprotein. *Aust. J. Plant Physiol.* **23**, 211-225.
- Brundrett MC, Enstone DE, Peterson CA (1988). A berberine-aniline blue fluorescent staining procedure for suberin, lignin, and callose in plant tissue. *Protoplasma* **146**, 133-142.

- Brundrett MC, Kendrick B, Peterson CA (1991). Efficient lipid staining in plant material with Sudan red 7B or fluorol yellow 088 in polyethylene glycol-glycerol. *Biotech. Histochem.* **66**, 111-116.
- Bush DR (1993). Proton-coupled sugar and amino acid transporters in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **44**, 513-542.
- Büttner M, Sauer N (2000). Monosaccharide transporters in plants: structure, function and physiology. *Biochim. Biophys. Acta* **1465**, 263-272.
- Campos F, Perez-Castineira JR, Villalba JM, Culianez-Marcia FA, Sanchez F, Serrano R (1996). Localization of plasma membrane H⁺-ATPase in nodules of *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Mol. Biol.* **32**, 1043-1053.
- Cardenas L, Holdaway-Clarke TL, Sanchez F, Quinto C, Feijo JA, Kunkel JG, Hepler PK (2000). Ion changes in legume root hairs responding to nod factors. *Plant Physiol.* **123**, 443-452.
- Cho BH, Sauer N, Komor E, Tanner W (1981). Glucose induces two amino acid transport systems in *Chlorella*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 3591-3594.
- Christiansen JH, Rosendahl L, Widell S (1995). Preparation and characterization of sealed inside-out peribacteroid membrane vesicles from *Pisum sativum* L. and *Glycine max* L. root nodules by aqueous polymer two-phase partitioning. *J. Plant Physiol.* **147**, 175-181.
- Cocking EC (1972). Plant cell protoplasts - isolation and development. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **23**, 29-50.
- Cohn J, Day RB, Stacey G (1998). Legume nodule organogenesis. *Trends Plant Sci.* **3**, 105-110.
- Cooper HD, Clarkson DT (1989). Cycling of amino-nitrogen and other nutrients between shoots and roots in cereals - a possible mechanism integrating shoot and root in the regulation of nutrient uptake. *J. Exp. Bot.* **40**, 753-762.

- Copeland L, Vella J, Hong ZQ (1989). Enzymes of carbohydrate metabolism in soybean nodules. *Phytochemistry* **28**, 57-61.
- Curioni PMG, Hartwig UA, Nösberger J, Schuller KA (1999). Glycolytic flux is adjusted to nitrogenase activity in nodules of detopped and argon-treated alfalfa plants. *Plant Physiol.* **119**, 445-453.
- Dalla Vecchia F, Cuccato F, La Rocca N, Larcher W, Rascio N (2000). Endodermis-like sheaths in the submerged freshwater macrophyte *Ranunculus trichophyllus* Chaix. *Ann. Bot.* **83**, 93-97.
- Davey MR, Cocking EC, Bush E (1973). Isolation of legume root nodule protoplasts. *Nature* **244**, 460-461.
- Davey MR, Pearce N, Cocking EC (1980). Fusion of legume root nodule protoplasts with non-legume protoplasts: ultrastructural evidence for the functional activity of *Rhizobium* bacteroids in a heterokaryotic cytoplasm. *Z. Pflanzenphysiol.* **99**, 435-447.
- de Jong A, Koerselman-Kooij JW, Schuurmans JAMJ, Borstlap AC (1997). The mechanisms of amino acid efflux from seed coats of developing pea seeds as revealed by uptake experiments. *Plant Physiol.* **114**, 731-736.
- de Jong A, Wolswinkel P (1995). Differences in release of endogenous sugars and amino acids from attached and detached seed coats of developing pea seeds. *Physiol. Plant.* **94**, 78-86.
- de Lorenzo C, Iannetta PPM, Fernandez-Pascual M, James EK, Lucas MM, Sprent JI, Witty JF, Minchin FR, De Felipe MR (1993). Oxygen diffusion in lupin nodules. II. Mechanisms of diffusion barrier operation. *J. Exp. Bot.* **44**, 1469-1474.
- de Ruyter H, Schuurmans J, Kollöffel C (1984). Amino acid leakage from cotyledons of developing and germinating pea seeds. *J. Plant Physiol.* **116**, 47-57.

- de Visser R, Poorter H (1984). Growth and root nodule nitrogenase activity of *Pisum sativum* as influenced by transpiration. *Physiol. Plant.* **61**, 637-642.
- Delrot S (1981). Proton fluxes associated with sugar uptake in *Vicia faba* leaf tissues. *Plant Physiol.* **68**, 706-711.
- Delrot S (2000). Regulation of sugar, amino acid and peptide plant membrane transporters. *Biochim. Biophys. Acta* **1465**, 281-306.
- Denison RF (1998). Decreased oxygen permeability: a universal stress response in legume root nodules. *Bot. Acta* **111**, 191-192.
- Despeghel J-P, Delrot S (1983). Energetics of amino acid uptake by *Vicia faba* leaf tissues. *Plant Physiol.* **71**, 1-6.
- Dietz K-J, Martinoia E, Heber U (1989). Mobilisation of vacuolar amino acids in leaf cells as affected by ATP and the level of cytosolic amino acids: ATP regulates but appears not to energize vacuolar amino-acid release. *Biochim. Biophys. Acta* **984**, 57-62.
- Dunn KR, Dickstein R, Feinbaum R, Burnett BK, Peterman TK, Thoidis G, Goodman HM, Ausubel FM (1988). Developmental regulation of nodule-specific genes in alfalfa root nodules. *Mol. Plant Microbe Interact.* **1**, 66-74.
- Ehlers K, Kollmann R (1996). Formation of branched plasmodesmata in regenerating *Solanum nigrum*-protoplasts. *Planta* **199**, 126-138.
- Elzenga JTM, Keller CP, van Volkenburgh E (1991). Patch clamping protoplasts from vascular plants. *Plant Physiol.* **97**, 1573-1575.
- Enstone DE, Peterson CA (1992a). A rapid fluorescence technique to probe the permeability of the root apoplast. *Can. J. Bot.* **70**, 1493-1501.
- Enstone DE, Peterson CA (1992b). The apoplastic permeability of root apices. *Can. J. Bot.* **70**, 1502-1512.

- Falbe J, Regitz M (1995). CD Römpp Chemie Lexikon. 9. Auflage. Thieme, Stuttgart, Germany.
- Fedorova E, Thomson R, Whitehead LF, Maudoux O, Udvardi MK, Day DA (1999). Localization of H⁺-ATPases in soybean root nodules. *Planta* **209**, 25-32.
- Felle H, Gogarten JP, Bentrup F-W (1983). Phlorizin inhibits hexose transport across the plasmalemma of *Riccia fluitans*. *Planta* **157**, 267-270.
- Felle HH, Kondorosi E, Kondorosi A, Schultze M (2000). How alfalfa root hairs discriminate between nod factors and oligochitin elicitors. *Plant Physiol.* **124**, 1373-1380.
- Fieuw S, Willenbrink J (1991). Isolation of protoplasts from tomato fruit (*Lycopersicon esculentum*): first uptake studies. *Plant Sci.* **76**, 9-17.
- Fischer WN, André B, Rentsch D, Krolkiewicz S, Tegeder M, Breitzkreuz K, Frommer WB (1998). Amino acid transport in plants. *Trends Plant Sci.* **3**, 188-195.
- Franceschi VR, Giaquinta RT (1983). The paraveinal mesophyll of soybean leaves in relation to assimilate transfer and compartmentation. I. Ultrastructure and histochemistry during vegetative development. *Planta* **157**, 411-421.
- Frazer HL (1942). The occurrence of endodermis in leguminous root nodules and its effect on nodule function. *Proc. Royal Soc. Edinburgh* **61B**, 328-343.
- Frommer WB, Kwart M, Hirner B, Fischer WN, Hummel S, Ninnemann O (1994). Transporters for nitrogenous compounds in plants. *Plant Mol. Biol.* **26**, 1651-1670.
- Galun E (1981). Plant protoplasts as physiological tools. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **32**, 237-266.
- Galvez S, Hirsch AM, Wycoff KL, Hunt S, Layzell DB, Kondorosi A, Crespi M (2000). Oxygen regulation of a nodule-located carbonic anhydrase in alfalfa. *Plant Physiol.* **124**, 1059-1068.

- Gamborg OL, Phillips GC (1995). Basal media for plant cell and tissue culture. *In*: Gamborg OL, Phillips GC. Plant cell, tissue and organ culture. Springer, Berlin, Germany. pp. 301-308.
- Gericke S, Kurmies B (1952). Die kolorimetrische Phosphorsäurebestimmung mit Ammonium-Vanadat-Molybdat und ihre Anwendung in der Pflanzenanalyse. *Z. Pflanzenernähr. Düng. Bodenk.* **59**, 235-247.
- Getz H-P, Knauer D, Willenbrink J (1987). Transport of sugars across the plasma membrane of beetroot protoplasts. *Planta* **171**, 185-196.
- Gordon AJ (1991). Enzyme distribution between the cortex and the infected region of soybean nodules. *J. Exp. Bot.* **42**, 961-967.
- Gordon AJ, James CL (1997). Enzymes of carbohydrate and amino acid metabolism in developing and mature nodules of white clover. *J. Exp. Bot.* **48**, 895-903.
- Gordon AJ, Minchin FR, James CL, Komina O (1999). Sucrose synthase in legume nodules is essential for nitrogen fixation. *Plant Physiol.* **120**, 867-877.
- Gordon AJ, Minchin FR, Skot L, James CL (1997). Stress-induced declines in soybean N₂ fixation are related to nodule sucrose synthase activity. *Plant Physiol.* **114**, 937-946.
- Gordon AJ, Thomas BJ, James CL (1995). The location of sucrose synthase in root nodules of white clover. *New Phytol.* **130**, 523-530.
- Gordon AJ, Thomas BJ, Reynolds PHS (1992). Localization of sucrose synthase in soybean root nodules. *New Phytol.* **122**, 35-44.
- Gresshoff PM, Rolfe BG (1978). Viability of *Rhizobium* bacteroids isolated from soybean nodule protoplasts. *Planta* **142**, 329-333.
- Guérin V, Trinchant JC, Rigaud J (1990). Nitrogen fixation (C₂H₂ reduction) by broad bean (*Vicia faba* L.) nodules and bacteroids under water-restricted conditions. *Plant Physiol.* **92**, 595-601.

- Guglielminetti L, Wu Y, Boschi E, Yamaguchi J, Favati A, Vergara M, Perata P, Alpi A (1997). Effects of anoxia on sucrose degrading enzymes in cereal seeds. *J. Plant Physiol.* **150**, 251-258.
- Györgyey J, Vaubert D, Jiménez-Zurdo JI, Charon C, Troussard L, Kondorosi A, Kondorosi E (2000). Analysis of *Medicago truncatula* nodule expressed sequence tags. *Mol. Plant Microbe Interact.* **13**, 62-71.
- Hanks JF, Schubert K, Tolbert NE (1983). Isolation and characterisation of infected and uninfected cells from soybean nodules. *Plant Physiol.* **71**, 869-873.
- Hartmann K, Peiter E, Koch K, Schubert S, Schreiber L (2002). Chemical composition and ultrastructure of broad bean (*Vicia faba* L.) nodule endodermis in comparison to the root endodermis. *Planta* **215**, 14-25.
- Hartwig UA, Heim I, Lüscher A, Nösberger J (1994). The nitrogen-sink is involved in the regulation of nitrogenase activity in white clover after defoliation. *Physiol. Plant.* **92**, 375-382.
- Hartwig UA, Trommler J (2001). Increase in the concentrations of amino acids in the vascular tissue of white clover and white lupin after defoliation: an indication of a N feedback regulation of symbiotic N₂ fixation. *Agronomie* **21**, 615-620.
- Haupt S, Duncan GH, Holzberg S, Oparka KJ (2001). Evidence for symplastic phloem unloading in sink leaves of barley. *Plant Physiol.* **125**, 209-218.
- Hayek EWH, Jordis U, Moche W, Sauter F (1989). A bicentennial of betulin. *Phytochemistry* **28**, 2229-2242.
- Heim I, Hartwig UA, Nösberger J (1993). Current nitrogen fixation is involved in the regulation of nitrogenase activity in white clover (*Trifolium repens* L.). *Plant Physiol.* **103**, 1009-1014.

- Heineke D, Sonnewald U, Büssis D, Günter G, Leidreiter K, Wilke I, Raschke K, Willmitzer L, Heldt HW (1992). Apoplastic expression of yeast-derived invertase in potato. *Plant Physiol.* **100**, 301-308.
- Herdina, Silsbury JH (1990). Estimating nitrogenase activity of faba bean (*Vicia faba* L.) by acetylene reduction (AR) assay. *Aust. J. Plant Physiol.* **17**, 489-502.
- Herrada G, Puppo A, Rigaud J (1989). Uptake of metabolites by bacteroid-containing vesicles and by free bacteroids from french bean nodules. *J. Gen. Microbiol.* **135**, 3165-3171.
- Hirsch AM (1992). Developmental biology of legume nodulation. *New Phytol.* **122**, 211-237.
- Hirsch PR (1996). Population dynamics of indigenous and genetically modified rhizobia in the field. *New Phytol.* **133**, 159-171.
- Hoh CH, Broughton WJ (1975). Protoplasts from legume root nodules. In: Rajarao JC, Paranjothy K, eds. *Proceedings of the National Tissue Culture Symposium*. Rubber Research Institute of Malaysia, Kuala Lumpur, Malaysia. pp. 42-50.
- Hunt S, Layzell DB (1993). Gas exchange of legume nodules and the regulation of nitrogenase activity. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **44**, 483-511.
- Iannetta PPM, De Lorenzo C, James EK, Fernandez-Pascual M, Sprent JI, Lucas MM, Witty JF, De Felipe MR, Minchin FR (1993). Oxygen diffusion in lupin nodules. I. Visualization of diffusion barrier operation. *J. Exp. Bot.* **44**, 1461-1467.
- Jacobsen KR, Rousseau RA, Denison RF (1998). Tracing the path of oxygen into birdsfoot trefoil and alfalfa nodules using iodine vapor. *Bot. Acta* **111**, 193-203.
- Jang J-C, Sheen J (1997). Sugar sensing in higher plants. *Trends Plant Sci.* **2**, 208-214.

- Jiménez-Zurdo JI, Frugier F, Crespi MD, Kondorosi A (2000). Expression profiles of 22 novel molecular markers for organogenic pathways acting in alfalfa nodule development. *Mol. Plant Microbe Interact.* **13**, 96-106.
- Kaiser BN, Finnegan PM, Tyerman SD, Whitehead LF, Bergersen FJ, Day DA, Udvardi MK (1998). Characterization of an ammonium transport protein from the peribacteroid membrane of soybean nodules. *Science* **281**, 1202-1206.
- Kaiser G, Heber U (1984). Sucrose transport into vacuoles isolated from barley mesophyll protoplasts. *Planta* **161**, 562-568.
- Kajita S, Matsui C, Syono K, Suzuki M, Nagata T (1980). Fine structure of fusion bodies formed between pea root nodule and tobacco mesophyll protoplasts. *Z. Pflanzenphysiol.* **97**, 233-240.
- Kavroulakis N, Flemetakis E, Aivalakis G, Katinakis P (2000). Carbon metabolism in developing soybean root nodules: The role of carbonic anhydrase. *Mol. Plant Microbe Interact.* **13**, 14-22.
- Kearns A, Whelan J, Young S, Elthon TE, Day DA (1992). Tissue-specific expression of the alternative oxidase in soybean and siratro. *Plant Physiol.* **99**, 712-717.
- Klingenberg M, Pfaff E (1967). Means of terminating reactions. *Methods Enzymol.* **10**, 680-684.
- Knight TJ, Langston-Unkefer PJ (1988). Enhancement of symbiotic dinitrogen fixation by a toxin-releasing plant pathogen. *Science* **241**, 951-954.
- Koch KE (1996). Carbohydrate-modulated gene expression in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **47**, 509-540.
- Kouchi H, Fukai K, Hiroki K, Kiwamu M, Shigeyuki T (1988). Isolation and enzymological characterization of infected and uninfected cell protoplasts from root nodules of *Glycine max*. *Physiol. Plant.* **73**, 327-334.

- Kuzma MM, Winter H, Storer P, Oresnik IJ, Atkins CA, Layzell DB (1999). The site of oxygen limitation in soybean nodules. *Plant Physiol.* **119**, 399-407.
- Kühn C, Barker L, Bürkle L, Frommer W-B (1999). Update on sucrose transport in higher plants. *J. Exp. Bot.* **50**, 935-953.
- Küster H, Frühling M, Perlick AM, Pühler A (1993). The sucrose synthase gene is predominantly expressed in the root nodule tissue of *Vicia faba*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **6**, 507-514.
- Layzell DB, Moloney AHM (1994). Dinitrogen Fixation. *In*: Boote KJ, Bennett JM, Sinclair TR, Paulsen GM, eds. Physiology and Determination of Crop Yield. American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin, USA. pp. 311-335.
- Lee H-S, Copeland L (1994). Ultrastructure of chickpea nodules. *Protoplasma* **182**, 32-38.
- Lemoine R (2000). Sucrose transporters in plants: update on function and structure. *Biochim. Biophys. Acta* **1465**, 246-262.
- Li Y, Day DA (1991). Permeability of isolated infected cells from soybean nodules. *J. Exp. Bot.* **42**, 1325-1329.
- Lin W (1980). Corn root protoplasts: Isolation and general characterization of ion transport. *Plant Physiol.* **66**, 550-554.
- Lin W, Schmitt MR, Hitz WD, Giaquinta RT (1984a). Sugar transport in isolated corn root protoplasts. *Plant Physiol.* **76**, 894-897.
- Lin W, Schmitt MR, Hitz WD, Giaquinta RT (1984b). Sugar transport into protoplasts isolated from developing soybean cotyledons. I. Protoplast isolation and general characteristics of sugar transport. *Plant Physiol.* **75**, 936-940.
- Long SR (2001). Genes and signals in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Plant Physiol.* **125**, 69-72.

- Loomis WD, Battaile J (1966). Plant phenolic compounds and the isolation of plant enzymes. *Phytochemistry* **5**, 423-438.
- M'Batchi B, Delrot S (1988). Stimulation of sugar exit from leaf tissues of *Vicia faba* L. *Planta* **174**, 340-348.
- Marré E (1979). Fusicoccin: A tool in plant physiology. *Annu Rev Plant Physiol* **30**, 273-288.
- Marschner H, Kirkby EA, Engels C (1997). Importance of cycling and recycling of mineral nutrients within plants for growth and development. *Bot. Acta* **110**, 265-273.
- Martinez-Abarca F, Herrera-Cervera JA, Bueno P, Sanjuan J, Bisseling T, Olivares J (1998). Involvement of salicylic acid in the establishment of the *Rhizobium meliloti*-alfalfa symbiosis. *Mol. Plant Microbe Interact.* **11**, 153-155.
- Matamoros MA, Baird LM, Escuredo PR, Dalton DA, Minchin FR, Iturbe-Ormaotxe I, Rubio MC, Moran JF, Gordon AJ, Becana M (1999). Stress-induced legume root nodule senescence. Physiological, biochemical, and structural alterations. *Plant Physiol.* **121**, 97-111.
- Maudoux O, Batoko H, Oecking C, Gevaert K, Vandekerckhove J, Boutry M, Morsomme P (2000). A plant plasma membrane H⁺-ATPase expressed in yeast is activated by phosphorylation at its penultimate residue and binding of 14-3-3 regulatory proteins in the absence of fusicoccin. *J. Biol. Chem.* **275**, 17762-17770.
- Maynard JW, Lucas WJ (1982a). A reanalysis of the two-component phloem loading system in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.* **69**, 734-739.
- Maynard JW, Lucas WJ (1982b). Sucrose and glucose uptake into *Beta vulgaris* leaf tissues. A case for a general (apoplastic) retrieval system. *Plant Physiol.* **70**, 1436-1443.

- McClure PR, Israel DW (1979). Transport of nitrogen in the xylem of soybean plants. *Plant Physiol.* **64**, 411-416.
- McDonald R, Fieuw S, Patrick JW (1996a). Sugar uptake by the dermal transfer cells of developing cotyledons of *Vicia faba* L. Mechanism of energy coupling. *Planta* **198**, 502-509.
- McDonald R, Fieuw S, Patrick JW (1996b). Sugar uptake by the dermal transfer cells of developing cotyledons of *Vicia faba* L. Experimental systems and general transport properties. *Planta* **198**, 54-63.
- Mengel K (1994). Symbiotic dinitrogen fixation - its dependence on plant nutrition and its ecophysiological impact. *Z. Pflanzenernähr. Bodenk.* **157**, 233-241.
- Mengel K and Schubert S (1985). Active extrusion of protons into deionized water by intact maize plants. *Plant Physiol.* **79**, 344-348.
- Minchin FR (1997). Regulation of oxygen diffusion in legume nodules. *Soil Biol. Biochem.* **29**, 881-888.
- Minchin FR, Pate JS (1973). The carbon balance of a legume and the functional economy of its root nodules. *J. Exp. Bot.* **24**, 259-271.
- Minchin FR, Summerfield RJ, Hadley P, Roberts EH, Rawsthorne S (1981). Carbon and nitrogen nutrition of nodulated roots of grain legumes. *Plant Cell Environ.* **4**, 5-26.
- Minchin FR, Sheehy JE, Witty JF (1986). Further errors in the acetylene reduction assay: Effects of plant disturbance. *J. Exp. Bot.* **37**, 1581-1591.
- Miranda M, Borisjuk L, Tewes A, Heim U, Sauer N, Wobus U, Weber H (2001). Amino acid permeases in developing seeds of *Vicia faba* L.: expression precedes storage protein synthesis and is regulated by amino acid supply. *Plant J.* **28**, 61-71.

- Montamat F, Maurousset L, Tegeder M, Frommer W, Delrot S (1999). Cloning and expression of amino acid transporters from broad bean. *Plant Mol. Biol.* **41**, 259-268.
- Morell M, Copeland L (1984). Enzymes of sucrose breakdown in soybean nodules. Alkaline invertase. *Plant Physiol.* **74**, 1030-1034.
- Morell M, Copeland L (1985). Sucrose synthase of soybean nodules. *Plant Physiol.* **78**, 149-154.
- Moulin L, Munive A, Dreyfus B, Boivin-Masson C (2001). Nodulation of legumes by members of the β -subclass of Proteobacteria. *Nature* **411**, 871-976.
- Muller B, Touraine B (1992). Inhibition of NO_3^- uptake by various phloem-translocated amino acids in soybean seedlings. *J. Exp. Bot.* **43**, 617-623.
- Navarro-Gonzalez R, McKay CP, Mvondo DN (2001). A possible nitrogen crisis for Archaean life due to reduced nitrogen fixation by lightning. *Nature* **412**, 61-64.
- Neo HH, Layzell DB (1997). Phloem glutamine and the regulation of O_2 diffusion in legume nodules. *Plant Physiol.* **113**, 259-267.
- Neumann G, Massonneau A, Langlade N, Dinkelaker B, Hengeler C, Römheld V, Martinoia E (2000). Physiological aspects of cluster root function and development in phosphorus-deficient white lupin (*Lupinus albus* L.). *Ann. Bot.* **85**, 909-919.
- Neumann G, Massonneau A, Martinoia E, Römheld V (1999). Physiological adaptations to phosphorus deficiency during proteoid root development in white lupin. *Planta* **208**, 373-382.
- Neumann KH (1995). Pflanzliche Zell- und Gewebekulturen. Ulmer, Stuttgart, Germany.

- Newcomb W (1976). A correlated light and electron microscopic study of symbiotic growth and differentiation in *Pisum sativum* root nodules. *Can. J. Bot.* **54**, 2163-2186.
- Newcomb W, Peterson RL (1979). The occurrence and ontogeny of transfer cells associated with lateral roots and root nodules in Leguminosae. *Can. J. Bot.* **57**, 2583-2602.
- Newcomb W, Sippell D, Peterson RL (1979). The early morphogenesis of *Glycine max* and *Pisum sativum* root nodules. *Can. J. Bot.* **57**, 2603-2616.
- Olsson JE, Gresshoff PM (1984). Analysis of the acetylene reducing ability of root nodule protoplasts isolated from *Glycine max*. *Z. Pflanzenphysiol.* **113**, 471-476.
- Oparka KJ, Roberts AG (2001). Plasmodesmata. A not so open-and-shut case. *Plant Physiol.* **125**, 123-126.
- Ortiz-Lopez A, Chang H-C, Bush DR (2000). Amino acid transporters in plants. *Biochim. Biophys. Acta* **1465**, 275-280.
- Oti-Boateng C, Silsbury JH (1993). The effects of exogenous amino acid on acetylene reduction activity of *Vicia faba* L. cv. Fiord. *Ann. Bot.* **71**, 71-74.
- Oti-Boateng C, Wallace W, Silsbury JH (1994). The effect of the accumulation of carbohydrate and organic nitrogen on dinitrogen fixation (acetylene reduction) of faba bean cv. Fiord. *Ann. Bot.* **73**, 143-149.
- Parsons R, Baker A (1996). Cycling of amino compounds in symbiotic lupin. *J. Exp. Bot.* **47**, 421-429.
- Parsons R, Stanforth J, Raven JA, Sprent JI (1993a). Nodule growth and activity may be regulated by a feedback mechanism involving phloem nitrogen. *Plant Cell Environ.* **16**, 125-136.

- Parsons R, Morris RN, Baker A (1993b). Whole plant regulation of N₂ fixation in soybean: The role of C/N ratio and nitrogen translocation. *In*: Tikhonovich IA, Provorov NI, Romanov VI, Newton WE, eds. Nitrogen Fixation. Fundamentals and Applications. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht,NL. p. 588.
- Pate JS (1975). Transport in symbiotic systems fixing nitrogen. *In*: Luttge U, Pitman MG, eds. Encyclopedia of Plant Physiology, New Series, Vol. 2. Transport in Plants II, Part B. Springer, Berlin, Germany. pp. 278-303
- Pate JS, Atkins CA, Hamel K, McNeil DL, Layzell DB (1979). Transport of organic solutes in phloem and xylem of a nodulated legume. *Plant Physiol.* **63**, 1082-1088.
- Pate JS, Gunning BES, Briarty LG (1969). Ultrastructure and functioning of the transport system of the leguminous root nodule. *Planta* **85**, 11-34.
- Patrick JW (1997). Phloem unloading: Sieve element unloading and post-sieve element transport. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**, 191-222.
- Pawlowski K (1997). Nodule specific gene expression. *Physiol. Plant.* **99**, 617-631.
- Peiter E, Yan F, Schubert S (2000). Are mineral nutrients a critical factor for lime intolerance of lupins? *J. Plant Nutr.* **23**, 617-635.
- Peterson CA, Lefcourt EM (1990). Development of endodermal Casparian bands and xylem in lateral roots of broad bean. *Can. J. Bot.* **68**, 2729-2735.
- Peterson CA, Steudle E (1993). Lateral hydraulic conductivity of early metaxylem vessels in *Zea mays* L. roots. *Planta* **189**, 288-297.
- Peterson CA, Enstone DE (1996). Functions of passage cells in the endodermis and exodermis of roots. *Physiol. Plant.* **97**, 592-598.
- Peterson CA, Cholewa E (1998). Structural modifications of the apoplast and their potential impact on ion uptake. *Z. Pflanzenernähr. Bodenk.* **161**, 521-531.

- Peuke AD, Kaiser WM (1997). Nitrate or ammonium uptake and transport, and rapid regulation of nitrate reduction in higher plants. *Progress in Botany* (6), Springer, Berlin, Germany. pp. 93-113.
- Pladys D, Dimitrijevic L, Rigaud J (1991). Localisation of a protease in protoplast preparations in infected cells of french bean nodules. *Plant Physiol.* **97**, 1174-1180.
- Plies-Blazer E, Kong T, Schubert S, Mengel K (1995). Effect of water stress on plant growth, nitrogenase activity and nitrogen economy of four different cultivars of *Vicia faba* L. *Eur. J. Agron.* **4**, 167-173.
- Pohlmeyer K, Soll J, Steinkamp T, Hinnah S, Wagner R (1997). Isolation and characterization of an amino acid-selective channel protein present in the chloroplastic outer envelope membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 9504-9509.
- Ralston EJ, Imsande J (1982). Entry of oxygen and nitrogen into intact soybean nodules. *J. Exp. Bot.* **33**, 208-214.
- Reibach PH, Streeter JG (1983). Metabolism of ¹⁴C-labeled photosynthate and distribution of enzymes of glucose metabolism in soybean nodules. *Plant Physiol.* **72**, 634-640.
- Reinhold L, Kaplan A (1984). Membrane transport of sugars and amino acids. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **35**, 45-83.
- Rentsch D, Boorer KJ, Frommer WB (1998). Structure and function of plasma membrane amino acid, oligopeptide and sucrose transporters from higher plants. *J. Membr. Biol.* **162**, 177-190.
- Reynolds ES (1963). The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain for electron microscopy. *J. Cell Biol.* **17**, 208-212.

- Riesmeier JW, Willmitzer L, Frommer WB (1992). Isolation and characterization of a sucrose carrier cDNA from spinach by functional expression in yeast. *EMBO J.* **11**, 4713.
- Ritte G, Rosenfeld J, Rohrig K, Raschke K (1999). Rates of sugar uptake by guard cell protoplasts of *Pisum sativum* L. related to the solute requirement for stomatal opening. *Plant Physiol.* **121**, 647-655.
- Robertson JG, Taylor MP (1973). Acid and alkaline invertases in roots and nodules of *Lupinus angustifolius* infected with *Rhizobium lupini*. *Planta* **112**, 1-6.
- Rosen H (1957). A modified ninhydrin colorimetric analysis for amino acids. *Arch. Biochem. Biophys.* **67**, 10-15.
- Roughley RJ (1970). The influence of root temperature, *Rhizobium* strain and host selection on the structure and nitrogen-fixing efficiency of the root nodules of *Trifolium subterraneum*. *Ann. Bot.* **34**, 631-646.
- Roughley RJ, Dart PJ, Day JM (1976a). The structure and development of *Trifolium subterraneum* L. root nodules. I. In plants grown at optimal root temperatures. *J. Exp. Bot.* **27**, 431-440.
- Roughley RJ, Dart PJ, Day JM (1976b). The structure and development of *Trifolium subterraneum* L. root nodules. II. In plants grown at sub-optimal root temperatures. *J. Exp. Bot.* **27**, 441-450.
- Rudbeck A, Mouritzen P, Rosendahl L (1999). Characterization of aspartate transport across the symbiosome membrane in pea root nodules. *J. Plant Physiol.* **155**, 576-583.
- Schaller GE, Sussman MR (1988). Phosphorylation of the plasma-membrane H⁺-ATPase of oat roots by a calcium stimulated protein-kinase. *Planta* **173**, 509-518.

- Scherer HW, Danzeisen L (1980). Der Einfluss gesteigerter Stickstoffgaben auf die Entwicklung der Wurzelknöllchen, auf die symbiontische Stickstoffassimilation sowie auf das Wachstum und den Ertrag von Ackerbohnen (*Vicia faba* L.). *Z. Pflanzenernähr. Bodenk.* **143**, 464-470.
- Schetter G, Hess D (1977). Nitrogenase activity in protoplasts isolated from root nodules of *Glycine max.* *Biochem. Physiol. Pfl.* **171**, 63-67.
- Schreiber L, Hartmann K, Skrabs M, Zeier J (1999). Apoplastic barriers in roots: chemical composition of endodermal and hypodermal cell walls. *J. Exp. Bot.* **50**, 1267-1280.
- Schubert KR (1986). Products of biological nitrogen fixation in higher plants: synthesis, transport, and metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **37**, 539-574.
- Schubert S (1995). Nitrogen assimilation by legumes – processes and ecological limitations. *Fert. Res.* **42**, 99-107.
- Schubert S, Serraj R, Plies-Balzer E, Mengel K (1995). Effect of drought stress on growth, sugar concentrations and amino acid accumulation in N₂-fixing alfalfa (*Medicago sativa*). *J. Plant Physiol.* **146**, 541-546.
- Scott DB, Farnden KJF, Robertson JG (1976). Ammonia assimilation in lupin nodules. *Nature* **263**, 703-705.
- Selker JML (1988). Three-dimensional organization of uninfected tissue in soybean root nodules and its relation to cell specialization in the central region. *Protoplasma* **147**, 178-190.
- Selker JML, Newcomb EH (1985). Spatial relationships between uninfected and infected cells in root nodules of soybean. *Planta* **165**, 446-454.
- Serraj R, Fleurat-Lessard P, Jaillard B, Drevon JJ (1995). Structural changes in the inner-cortex cells of soybean root nodules are induced by short-term exposure to high salt or oxygen concentrations. *Plant Cell Environ.* **18**, 455-462.

- Serraj R, Sinclair TR, Purcell LC (1999a). Symbiotic N₂ fixation response to drought. *J. Exp. Bot.* **50**, 143-155.
- Serraj R, Vadez V, Denison RF, Sinclair TR (1999b). Involvement of ureides in nitrogen fixation inhibition in soybean. *Plant Physiol.* **119**, 289-296.
- Serrano R (1989). Structure and function of plasma membrane ATPase. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **40**, 61-94.
- Serrano R (1990). Recent molecular approaches to the physiology of the plasma membrane proton pump. *Bot. Acta* **103**, 230-234.
- Shakya R, Sturm A (1998). Characterization of source- and sink-specific sucrose/H⁺ symporters from carrot. *Plant Physiol.* **118**, 1473-1480.
- Sharpe PT (1988). *Methods of Cell Separation*. Elsevier, Amsterdam, NL.
- Sheehy JE, Minchin FR, Witty JF (1983). Biological control of the resistance to oxygen flux in nodules. *Ann. Bot.* **52**, 565-571.
- Shelp BG, Atkins CA, Storer PJ, Canbin DT (1983). Cellular and subcellular organisation of pathways of ammonia assimilation and ureide synthesis in nodules of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.). *Arch. Biochem. Biophys.* **224**, 429-441.
- Sieciechowicz KL, Joy KW, Ireland RJ (1988). The metabolism of asparagine in plants. *Phytochemistry* **27**, 663-671.
- Snapp SS, Vance CP (1986). Asparagine biosynthesis in alfalfa (*Medicago sativa* L.) root nodules. *Plant Physiol.* **82**, 390-395.
- Sprent JI (1980). Root nodule anatomy, type of export product and evolutionary origin in some *Leguminosae*. *Plant Cell Environ.* **3**, 35-43.
- Spurr AR (1969). A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J. Ultrastruct. Res.* **26**, 31-43.

- Stanzel M, Sjolund RD, Komor E (1988a). Transport of glucose, fructose and sucrose by *Streptanthus tortuosus* suspension cells. I. Uptake at low sugar concentration. *Planta* **174**, 201-209.
- Stanzel M, Sjolund RD, Komor E (1988b). Transport of glucose, fructose and sucrose by *Streptanthus tortuosus* suspension cells. II. Uptake at high sugar concentration. *Planta* **174**, 210-216.
- Stein JC, Hansen G (1999). Mannose induces an endonuclease responsible for DNA laddering in plant cells. *Plant Physiol.* **121**, 71-79.
- Steudle E, Peterson CA (1998). How does water get through roots? *J. Exp. Bot.* **49**, 775-788.
- Stougaard J (2000). Regulators and regulation of legume root nodule development. *Plant Physiol.* **124**, 531-540.
- Streeter JG (1982). Enzymes of sucrose, maltose, and α,α -trehalose catabolism in soybean root nodules. *Planta* **155**, 112-115.
- Streeter JG (1987). Effect of nitrate on the organic acid and amino acid composition of legume nodules. *Plant Physiol.* **85**, 774-779.
- Streeter JG (1992). Analysis of apoplastic solutes in the cortex of soybean nodules. *Physiol. Plant.* **84**, 584-592.
- Streeter JG (1993). Translocation - a key factor limiting the efficiency of nitrogen fixation in legume nodules. *Physiol. Plant.* **87**, 616-623.
- Streeter JG (1995). Recent developments in carbon transport and metabolism in symbiotic systems. *Symbiosis* **19**, 175-196.
- Streeter JG, Salminen SO (1992). Evidence supporting a non-phloem source of water for export of solutes in the xylem of soybean root nodules. *Plant Cell Environ.* **15**, 735-741.

- Sturm A, Tang G-Q (1999). The sucrose-cleaving enzymes of plants are crucial for development, growth and carbon partitioning. *Trends Plant Sci.* **4**, 401-407.
- Sung L, Moloney AH, Hunt S, Layzell DB (1991). The effect of excision on O₂ diffusion and metabolism in soybean nodules. *Physiol. Plant.* **83**, 67-74.
- Sutton WD, Jepsen NM (1975). Studies with detached lupin root nodules in culture. I. Maintenance and induction of acetylene reduction activity. *Plant Physiol.* **56**, 665-670.
- Syono K, Nagata T, Suzuki M, Kajita S, Matsui C (1979). Fusion of pea root nodule protoplasts with tobacco mesophyll protoplasts. *Z. Pflanzenphysiol.* **95**, 449-457.
- Szczyglowski K, Shaw RS, Wopereis J, Copeland S, Hamburger D, Kasiborski B, Dazzo FB, de Bruijn FJ (1998). Nodule organogenesis and symbiotic mutants of the model legume *Lotus japonicus*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **11**, 684-697.
- Ta T-C, Faris MA, Macdowall FDH (1986). Pathways of nitrogen metabolism in nodules of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Physiol.* **80**, 1002-1005.
- Tegeder M, Gebhardt D, Schieder O, Pickardt T (1995). Thidiazuron-induced plant regeneration from protoplasts of *Vicia faba* cv. Mythos. *Plant Cell Reports* **15**, 164-169.
- Tegeder M, Offler CE, Frommer WB, Patrick JW (2000). Amino acid transporters are localized to transfer cells of developing pea seeds. *Plant Physiol.* **122**, 319-326.
- Temple SJ, Vance CP, Gantt JS (1998). Glutamate synthase and nitrogen assimilation. *Trends Plant Sci.* **3**, 51-56.
- Thom M, Komor E, Marezki A (1982). Vacuoles from sugarcane suspension cultures: II. Characterization of sugar uptake. *Plant Physiol.* **69**, 1320-1325.

- Thorpe MR, Walsh KB, Minchin PEH (1998). Photoassimilate partitioning in nodulated soybean. I. ^{14}C methodology. *J. Exp. Bot.* **49**, 1805-1815.
- Thumfort PP, Atkins CA, Layzell DB (1994). A re-evaluation of the role of the infected cell in the control of O_2 diffusion in legume nodules. *Plant Physiol.* **105**, 1321-1333.
- Trepp GB, Plank DW, Gantt JS, Vance CP (1999b). NADH-glutamate synthase in alfalfa root nodules. Immunocytochemical localisation. *Plant Physiol.* **119**, 829-837.
- Trepp GB, Temple SJ, Bucciarelli B, Shi LF, Vance CP (1999c). Expression map for genes involved in nitrogen and carbon metabolism in alfalfa root nodules. *Mol. Plant Microbe Interact.* **12**, 526-535.
- Trepp GB, van de Mortel M, Yoshioka H, Miller SS, Samac DA, Gantt JS, Vance CP (1999a). NADH-glutamate synthase in alfalfa root nodules. Genetic regulation and cellular expression. *Plant Physiol.* **119**, 817-828.
- Trinchant JC, Guérin V, Rigaud J (1994). Acetylene reduction by symbiosomes and free bacteroids from broad bean (*Vicia faba* L.) nodules. *Plant Physiol.* **105**, 555-561.
- Trofimova MS, Smolenskaya IN, Drabkin AV, Galkin AV, Babakov AV (1997). Does plasma membrane H^+ -ATPase activation by fusicoccin involve protein kinase? *Physiol. Plant.* **99**, 221-226.
- Truernit E, Schmid J, Eppele P, Illig J, Sauer N (1996). The sink-specific and stress-regulated Arabidopsis *STP4* gene: Enhanced expression of a gene encoding a monosaccharide transporter by wounding, elicitors, and pathogen challenge. *Plant Cell* **8**, 2169-2182.
- Udvardi MK, Day DA (1997). Metabolite transport across symbiotic membranes of legume nodules. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**, 493-523.

- Udvardi MK, Ou Yang L-J, Young S, Day DA (1990). Sugar and amino acid transport across symbiotic membranes from soybean nodules. *Mol. Plant Microbe Interact.* **3**, 334-340.
- van Bel AJE, Oparka KJ (1995). On the validity of plasmodesmograms. *Bot. Acta* **108**, 174-182.
- van Cauwenberghe OR, Hunt S, Newcomb W, Canny MJ, Layzell DB (1994). Evidence that short-term regulation of nodule permeability does not occur in the inner cortex. *Physiol. Plant.* **91**, 477-487.
- Vance CP (2001). Symbiotic nitrogen fixation and phosphorus acquisition. Plant nutrition in a world of declining renewable resources. *Plant Physiol.* **127**, 390-397.
- Vance CP, Heichel GH (1991). Carbon in N₂ fixation: limitation or exquisite adaptation. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **42**, 373-392.
- Vance CP, Gantt JS (1992). Control of nitrogen and carbon metabolism in root nodules. *Physiol. Plant.* **85**, 266-274.
- Vincent JL, Brewin NJ (2000). Immunolocalization of a cysteine protease in vacuoles, vesicles, and symbiosomes of pea nodule cells. *Plant Physiol.* **123**, 521-530.
- Vogelzang SA, Prins HBA (1992). Plasmalemma patch clamp experiments in plant root cells: procedure for fast isolation of protoplasts with minimal exposure to cell wall degrading enzymes. *Protoplasma* **171**, 104-109.
- Walsh KB (1990). Vascular transport and soybean nodule function. III. Implications of a continual phloem supply of carbon and water. *Plant Cell Environ.* **13**, 893-901.
- Walsh KB (1995). Physiology of the legume nodule and its response to stress. *Soil Biol. Biochem.* **27**, 637-655.

- Walsh KB, Canny MJ, Layzell DB (1989a). Vascular transport and soybean nodule function: II. A role for phloem supply in product export. *Plant Cell Environ.* **12**, 713-723.
- Walsh KB, McCully ME, Canny MJ (1989b). Vascular transport and soybean nodule function: nodule xylem is a blind alley, not a throughway. *Plant Cell Environ.* **12**, 395-405.
- Walsh KB, Atkins RS, Low CS (1992). Vascular anatomy of fabaceous nodules of determinate growth. *Plant Cell Environ.* **15**, 849-854.
- Walsh KB, Thorpe MR, Minchin PEH (1998a). Photoassimilate partitioning in nodulated soybean. II. The effect of changes in photoassimilate availability shows that nodule permeability to gases is not linked to the supply of solutes or water. *J. Exp. Bot.* **49**, 1817-1825.
- Walsh KB, Thorpe MR, Minchin PEH (1998b). Photoassimilate partitioning in nodulated soybean. III. The effect of changes in nodule activity shows that carbon supply to the nodule is not linked to nodule nitrogen metabolism. *J. Exp. Bot.* **49**, 1827-1834.
- Waters JK, Hughes BLI, Purcell LC, Gerhardt KO, Mawhinney TP, Emerich DW (1998). Alanine, not ammonia, is excreted from N₂-fixing soybean nodule bacteroids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 12038-12042.
- Webb J, Sheehy JE (1991). Legume nodule morphology with regard to oxygen diffusion and nitrogen fixation. *Ann. Bot.* **67**, 77-83.
- Weber H, Borisjuk L, Heim U, Sauer N, Wobus U (1997). A role for sugar transporters during seed development: Molecular characterization of a hexose and a sucrose carrier in fava bean seeds. *Plant Cell* **9**, 895-908.
- Weerdenburg CA, Peterson CA (1984). Effect of secondary growth on the conformation and permeability of the endodermis of broad bean (*Vicia faba*),

- sunflower (*Helianthus annuus*), and garden balsam (*Impatiens balsamina*). *Can. J. Bot.* **62**, 907-910.
- Weisbach C, Hartwig UA, Heim I, Nösberger J (1996). Whole-nodule carbon metabolites are not involved in the regulation of oxygen permeability and nitrogenase activity in white clover nodules. *Plant Physiol.* **110**, 539-545.
- Weisbach C, Walther P, Hartwig UA, Nosberger J (1999). Electron microscopic investigation of water occlusions in intercellular spaces in the inner cortex of lucerne nodules. *J. Struct. Biol.* **126**, 59-71.
- Weise A, Barker L, Kuhn C, Lalonde S, Buschmann H, Frommer WB, Ward JM (2000). A new subfamily of sucrose transporters, SUT4, with low affinity/high capacity localized in enucleate sieve elements of plants. *Plant Cell* **12**, 1345-1356.
- Whitehead LF, Tyerman SD, Salom CL, Day DA (1995). Transport of fixed nitrogen across symbiotic membranes of legume nodules. *Symbiosis* **19**, 141-154.
- Widholm JM (1972). The use of fluorescein diacetate and phenosafranine for determining viability of cultured plant cells. *Stain Technol.* **47**, 189-194.
- Williams LE, Lemoine R, Sauer N (2000). Sugar transporters in higher plants - a diversity of roles and complex regulation. *Trends Plant Sci.* **5**, 283-290.
- Wilson CA, Peterson CA (1983). Chemical composition of the epidermal, hypodermal, endodermal and intervening cortical cell walls of various plant roots. *Ann. Bot.* **51**, 759-769.
- Witty JF, Skot L, Revsbech NP (1987). Direct evidence for changes in the resistance of legume root nodules to O₂ diffusion. *J. Exp. Bot.* **38**, 1129-1140.
- Wolfe J, Dowgert MF, Steponkus PL (1986). Mechanical study of the deformation and rupture of the plasma membrane of protoplasts during osmotic expansions. *J. Membr. Biol.* **93**, 63-74.

- Wooi KC, Broughton WJ (1979). Isolation and metabolism of *Vigna unguiculata* root nodule protoplasts. *Planta* **145**, 487-495.
- Wu F-S (1987). Localization of mitochondria in plant cells by vital staining with rhodamine 123. *Planta* **171**, 346-357.
- Wu F-S, Cahoon AB (1995). Plasmolysis facilitates the accumulation of protein and DNA into extra-plasmalemma spaces of intact plant cells. *Plant Sci.* **104**, 201-214.
- Wyse RE, Komor E (1984). Mechanism of amino acid uptake by sugarcane suspension cells. *Plant Physiol.* **76**, 865-870.
- Yan F, Schubert S, Mengel K (1992). Effect of low root medium pH on net proton release, root respiration, and root growth of corn (*Zea mays* L.) and broad bean (*Vicia faba* L.). *Plant Physiol.* **99**, 415-421.
- Yoshioka H, Gregerson RG, Samac DA, Hoevens KCM, Trepp GB, Gantt JS, Vance CP (1999). Aspartate aminotransferase in alfalfa nodules: Localisation of mRNA during effective and ineffective nodule development and promoter analysis. *Mol. Plant Microbe Interact.* **12**, 263-274.
- Zammit A, Copeland L (1993). Immunocytochemical localisation of nodule-specific sucrose synthase in soybean nodules. *Aust. J. Plant Physiol.* **20**, 25-32.
- Zeier J, Schreiber L (1998). Comparative investigation of primary and tertiary endodermal cell walls isolated from the roots of five monocotyledoneous species: chemical composition in relation to fine structure. *Planta* **206**, 349-361.
- Zeier J, Ruel K, Ryser U, Schreiber L (1999a). Chemical analysis and immunolocalisation of lignin and suberin in endodermal and hypodermal/rhizodermal cell walls of developing maize (*Zea mays* L.) primary roots. *Planta* **209**, 1-12.

Zeier J, Goll A, Yokoyama M, Karahara I, Schreiber L (1999b). Structure and chemical composition of endodermal and rhizodermal/hypodermal walls of several species. *Plant Cell Environ.* **22**, 271-279.

Zeng Y, Wu Y, Avigne WT, Koch KE (1998). Differential regulation of sugar-sensitive sucrose synthases by hypoxia and anoxia indicate complementary transcriptional and posttranscriptional responses. *Plant Physiol.* **116**, 1573-1583.

Zimmermann HM, Hartmann K, Schreiber L, Steudle E (2000). Chemical composition of apoplastic transport barriers in relation to radial hydraulic conductivity of corn roots (*Zea mays* L.). *Planta* **210**, 302-311.

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Prof. Dr. Sven Schubert bedanken für die interessante Fragestellung, stimulierende Diskussionen und hilfreiche Hinweise zum Verfassen von Publikationen.

Dr. Feng Yan leistete wertvolle Vorarbeiten für diese Arbeit und trug auch später durch seine große Hilfs- und Diskussionsbereitschaft entscheidend zum Gelingen des Projektes bei. Dr. Achim Wiese danke ich für anregende Diskussionen und Dr. Heike Rogalla für die kritische Durchsicht der Arbeit.

Von vielen Kollegen erhielt ich wertvolle, z.T. unpublizierte Tipps zur Lösung immerwährender methodischer Probleme. Besonders erwähnen möchte ich (in alphabetischer Reihenfolge) Dr. Katrin Ehlers (TEM von Protoplasten), Dr. Gudrun Hoffmann-Thoma (Transportstudien mit Protoplasten), Dr. Jafargholi Imani (Protoplastenisolation), Dr. Ursula Richter (TEM) und Dr. Hilde Zimmermann (Zellwandfärbungen).

Bei meinen HiWis, insbesondere Stefanie Schröder und Gina Gruber, möchte ich mich bedanken für die gewissenhafte Ausführung aller Arbeiten zu allen (un-)möglichen Tageszeiten.

Einige Kooperationspartner haben im Zusammenhang mit dieser Arbeit entscheidende Aspekte zum Verständnis der Transportwege im Knöllchen bearbeitet. Prof. Dr. Mohamed H. Abd-Alla und Dr. Hans-Werner Koyro führten Plasmodesmenzählungen durch und bereiteten Proben für die TEM-Analyse apoplastischer Barrieren vor. Klaus Hartmann und Prof. Dr. Lukas Schreiber ergänzten die mikroskopischen Zellwanduntersuchungen durch chemische Analysen corticaler Gewebe.

Dem Institut für Phytomedizin der JLU Giessen möchte ich für den Zugang zum Axioplan-Mikroskop und die Bereitstellung von Binokularen danken. Die automatische Titrationseinheit (Hydromobil) wurde freundlicherweise vom Institut für Pflanzenernährung der Universität Hohenheim zur Verfügung gestellt. Die für Protoplastenisolationen verwendete Pectolyase war ein Geschenk des Institutes für Botanik I (AG Felle).

Zahlreiche Arbeiten, wie Fluoreszenzmikroskopie, Cryomikrotomie, TEM, ¹⁴C-Transportstudien und Szintillationszählung wurden in Labors der Zentralen Biotechnischen Betriebseinheit (ZBB) der JLU Giessen durchgeführt. Dem Personal der ZBB danke ich für die gute Zusammenarbeit.

Prof. Dr. Dale Sanders erlaubte mir die Fertigstellung der Arbeit während meiner Postdoczeit in York. Für das entgegengebrachte Verständnis bedanke ich mich sehr.

Für das entspannte Arbeitsklima und viele schöne Stunden in meinem zweiten Zuhause bedanke ich mich ganz herzlich bei allen Institutsmitgliedern.

Das Projekt wurde finanziert durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG), Schwerpunktprogramm 717.

Das schönste Ergebnis dieses Projektes befindet sich nicht in dieser Arbeit.

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen Hilfsmittel als die angegebenen benutzt habe. Alle Stellen, die ich anderen Werken dem Wortlaut oder Sinn entsprechend entnommen habe, sind durch Quellenangaben kenntlich gemacht.

Edgar Peiter