Wahrnehmung und Interpretation symbiontischer Signale durch Pflanzen und ihre bakteriellen Partner

Martin Parniske und Martina Ried

Zusammenfassung

Symbiosen zwischen Pflanzenwurzeln und Mikroorganismen können dazu beitragen, den Bedarf an Düngemitteln in der Landwirtschaft zu reduzieren. So können die meisten Kulturpflanzen die arbuskuläre Mykorrhizasymbiose (AM-Symbiose) mit Pilzen eingehen, durch welche Phosphat effizienter aufgenommen wird. In einer zweiten Symbiose, der Wurzelknöllchensymbiose, nehmen Leguminosen (Schmetterlingsblütler) wie Erbsen, Klee und Sojabohnen Rhizobien, spezielle Bakterien, die Stickstoff aus der Luft in Ammonium umwandeln können, in ihre Zellen auf. Interessanterweise nehmen die Pflanzenwurzeln Rhizobien und AM-Pilze über sehr ähnliche Signalmoleküle, nämlich teilweise modifizierte *N*-Acetylglucosamin-Tetra- oder -Pentamere wahr, obwohl sich die daraus resultierenden Entwicklungsprozesse stark unterscheiden. Auch bei der Erkennung von pathogenen Mikroorganismen spielen *N*-Acetylglucosamin-tragende Signale eine Rolle; Pilze können über Chitin- und Bakterien über Peptidoglykanfragmente aus ihrer Zellwand erkannt werden.

Trotz des intrinsisch nachhaltigen Potenzials der Wurzelknöllchensymbiose hat zu viel des Guten allerdings zu globalen Problemen geführt: Der mit der Zerstörung natürlicher Ökosysteme verbundene großflächige Sojaanbau v. a. in Südamerika bildet die Grundlage für die Fleischproduktion in Europa. Der mit dem Sojaimport verbundene Stickstoffeintrag und die mit der Tierhaltung verbundene Methanproduktion bringen bedrohliche ökologische und klimatische Konsequenzen mit sich. Deshalb ist eine deutliche Reduktion des Fleischkonsums dringend geboten.

Summary

Perception and interpretation of symbiontic signals by plants and their microbial partners

Mutualistic symbioses between plant roots and microorganisms can reduce the demand for chemical fertilizers in agriculture. Most crops are able to establish arbuscular mycorrhiza (AM) symbiosis with fungi to take up phosphate more efficiently. A second symbiosis, nitrogen-fixing root nodule symbiosis, supersedes energy-intensive nitrogen fertilization: Legumes such as peas, clover and soybeans take up rhizobia – special bacteria that are capable of converting atmospheric nitrogen into ammonium – into their root cells. Plant root cells perceive rhizobia and AM fungi via very similar signaling molecules (*N*-acetylglucosamine tetra- or pentamers), even though the resultant developmental processes differ strongly. Interestingly, *N*-acetylglucosamine containing signals including fungal chitin- and bacterial peptidoglycan-fragments from their cell walls, also play a role in the recognition of pathogenic microorganisms.

Despite the intrinsic sustainability potential of the nitrogen-fixing root nodule symbiosis, too much of a good thing, however, has led to global problems: The massive increase in global meat production is largely based on soybean. Large scale soybean monoculture destroyed ecosystems in South America. Large scale animal production results in excessive methane and nitrogen release into the environment, which causes climate change and death zones in marine ecosystems, respectively. This calls for a considerable reduction in meat consumption.

✉ Prof. Dr. Martin Parniske, Dr. Martina Ried, Ludwig-Maximilians-Universität München, Fakultät für Biologie, Genetik, Großhaderner Straße 2–4, 82152 Martinsried; parniske@lmu.de

Rundgespräche Forum Ökologie, Bd. 45 »Die Sprache der Moleküle – Chemische Kommunikation in der Natur«, S. 105–116.
© 2016 Verlag Dr. Friedrich Pfeil, München – ISSN 2366–2875 – ISBN 978–3–89937–214–4

Einführung

Ein zentrales Objekt dieses Beitrags ist die Sojabohne (*Glycine max*), eine Leguminose, deren Kultur vor 6000 Jahren in China begann und die mittlerweile aufgrund des hohen Proteingehalts ihres Samens zu einem wesentlichen Faktor in der Tierhaltung und so zu einem ökonomischen und ökologischen »Global player« geworden ist. Jährlich werden fast 300 Megatonnen Sojabohnen produziert, was diese Pflanze zum Motor einer Milliarden-Dollar-Industrie macht.

Die Sojabohne kommuniziert mit verschiedenen Organismen wie Bakterien und Pilzen, aber auch mit Säugetieren – den Menschen eingeschlossen – über chemische Stoffe. Der folgende Beitrag wird einige dieser Interaktionen näher betrachten.

Interaktion mit Bakterien: Die Wurzelknöllchensymbiose

Da Pflanzen auf Stickstoff als Nährstoff angewiesen sind, gibt es sehr viele und sehr unterschiedliche Symbiosen zwischen Pflanzen und Stickstoff fixierenden Bakterien. Die Wurzelknöllchensymbiose ist eine sehr effiziente Variante, die durch die intrazelluläre Beherbergung der Symbionten gekennzeichnet ist. Sojabohnen bilden in Symbiose mit Rhizobien (Stickstoff fixierende Wurzelknöllchenbakterien) neue Organe an der Wurzel aus, so genannte Wurzelknöllchen. Diese Organe stellen technisch gesehen Fermenter dar, in denen Bakterien zu sehr hohen Konzentrationen angezogen werden. Das bakterielle Enzym Nitrogenase kann innerhalb der Wurzelknöllchen aus atmosphärischem Stickstoff (N_2) Ammonium (NH_4^+) herstellen, welches die Bakterien an die Pflanze liefern (Hellriegel & Willfarth 1888). Auf diese Weise werden pro Jahr 100 bis 175 Mio. Tonnen Stickstoff fixiert. Nitrogenase ist ein Enzym, das ausschließlich in Prokaryoten vorkommt und dort durch horizontalen Genaustausch weit verbreitet ist. Nitrogenaseaktivität erfordert verschiedene Metalle, die das Enzym allerdings auch sehr empfindlich gegenüber Sauerstoff machen. Die Sauerstoffempfindlichkeit ist möglicherweise einer der Gründe dafür, dass Pflanzen dieses Enzym im Laufe der Evolution nicht selber akquiriert haben, sondern hierfür auf Interaktionen mit Bakterien angewiesen sind.

Pflanzen, die ohne Rhizobien und in Abwesenheit von anderen Stickstoffquellen wachsen, bilden kaum Chlorophyll, dessen Tetrapyrrolring 4 Stickstoffatome enthält, wachsen kaum und sterben an Stickstoffmangel, während Pflanzen, die mit Rhizobien inokuliert werden, Wurzelknöllchen ausbilden (Abb. 1a,b, 2a,b), die komplett mit Bakterien besetzt sind (Abb. 1c,d). Diese knöllchentragenden Pflanzen werden von den Bakterien mit pflanzenverfügbaren Stickstoffverbindungen wie Ammonium versorgt, was zu beeindruckenden Wachstumsverbesserungen im Vergleich zu nicht inokulierten Pflanzen führt (Abb. 1a,b). Innerhalb der Wurzelknöllchenzellen bilden sich die Rhizobien in sog. Bakteroide um. Je nach Wirtspflanze sind die Bakteroide unterschiedlich geformte und oft vergrößerte Bakterienzellen (Abb. 1e), die Nitrogenase enthalten, Stickstoff fixieren und das so gewonnene Ammonium an die Pflanze liefern.

Um in die Wurzelzelle zu gelangen, nutzen die Bakterien den sog. Infektionsschlauch (Abb. 2c). Dabei handelt es sich um eine Struktur, die aktiv von der Pflanzenzelle ausgebildet wird, um den Rhizobien Eingang zu gewähren, zunächst durch die Wurzelhaare, dann in tiefere Zellschichten. In den Infektionsschläuchen können sich die Bakterien teilen und man nimmt an, dass sie sich durch die damit verbundene Zunahme des Gesamtvolumens in Richtung Wurzelinneres weiterschieben (Fournier et al. 2015). Sind sie über den Infektionsschlauch in den richtigen Zellen angekommen, werden sie in die Rindenzellen der Wurzel entlassen. Sie befinden sich aber niemals im direkten Kontakt mit dem Zytoplasma, sondern bleiben immer umgeben von einer sog. Peribakteroidenmembran (Abb. 1e), die sie von dem Zytoplasma der Pflanze abgrenzt, aber eine sehr enge Beziehung zwischen dem Stoffwechsel der Pflanze und dem der Rhizobien ermöglicht.

Pflanzliche Signalmoleküle: Flavonoide

Wie erkennen Rhizobien, dass sie sich in der Nähe einer Leguminosenwurzel befinden? Die Antwort auf diese wichtige Frage wurde in den 1980er Jahren in Science publiziert: über Flavonoide (Grundstruktur: Flavan, Abb. 3a) (Peters et al. 1986). Flavonoide stellen eine extrem diversifizierte Klasse von Pflanzeninhaltsstoffen dar. Sie

können in verschiedene strukturelle Gruppen eingeteilt werden, die unterschiedlichste Aufgaben innerhalb der Pflanze übernehmen, und sie kommen in den einzelnen Pflanzenorganen in unterschiedlicher Zusammensetzung vor. Sie übernehmen auch die Kommunikation mit der Außenwelt, sei es optisch, wenn sie z. B. über unterschiedliche Blütenfarben mit bestäubenden Insekten oder Vögeln kommunizieren, sei es chemisch, wie bei den Flavonoiden, die von der Wurzel ausgeschieden und von Rhizobien wahrgenommen werden.

Das Bakterium kann aufgrund des Flavonoidmusters erkennen, ob es sich um eine kompatible, »passende« Wirtspflanze handelt, da Leguminosenwurzeln spezifische Flavonoidbouquets exsudieren. Dadurch bilden die Flavonoide eine der beiden molekularen Grundlagen für das spezifische Wirtsspektrum der meisten Rhizobien. So reagiert der Mikrosymbiont der Sojabohne (*Glycine max*), *Bradyrhizobium japonicum*, mit der Aktivierung der Nodulationsgene (*nod*-Gene) und der Synthese des Nod-Faktors, wenn er von der Wurzel exsudiertes Isoliquiritigenin (Abb. 3b) über spezifische Rezeptorproteine wahrnimmt. Der Nod-Faktor ist ein Produkt, das letztendlich vom Rhizobium ausgeschieden und von der Pflanzenwurzel ebenfalls über Rezeptorproteine wahrgenommen wird und dieser wiederum signalisiert, dass ein zur Symbiose kompatibles Rhizobium in der Rhizosphäre vorhanden ist.

Auch haben unterschiedliche Zwischenprodukte in der Flavonoidbiosynthese ganz unterschiedliche Wirkungen auf Rhizobien (Tab. 1). Im Gegensatz zu Isoliquiritigenin, das keine chemoattraktive Wirkung aufweist, induziert beispielsweise Zimtsäure (Abb. 3c) eine starke Chemotaxis, was dazu führt, dass die Rhizobien darauf zuschwimmen. Neben der Kommunikation mit Rhizobien haben Flavonoide in der Sojabohne eine Reihe weiterer Funktionen.

Sojabohnenkeimlinge beinhalten beispielsweise Coumestrol (Abb. 3d), ein Flavonoid mit hormonähnlicher Wirkung (ein so genanntes Phytoöstrogen), das auch in Klee vorkommt. Coumestrol bedient den Östradiolrezeptor und führt dadurch zu massiven hormonellen Verän-

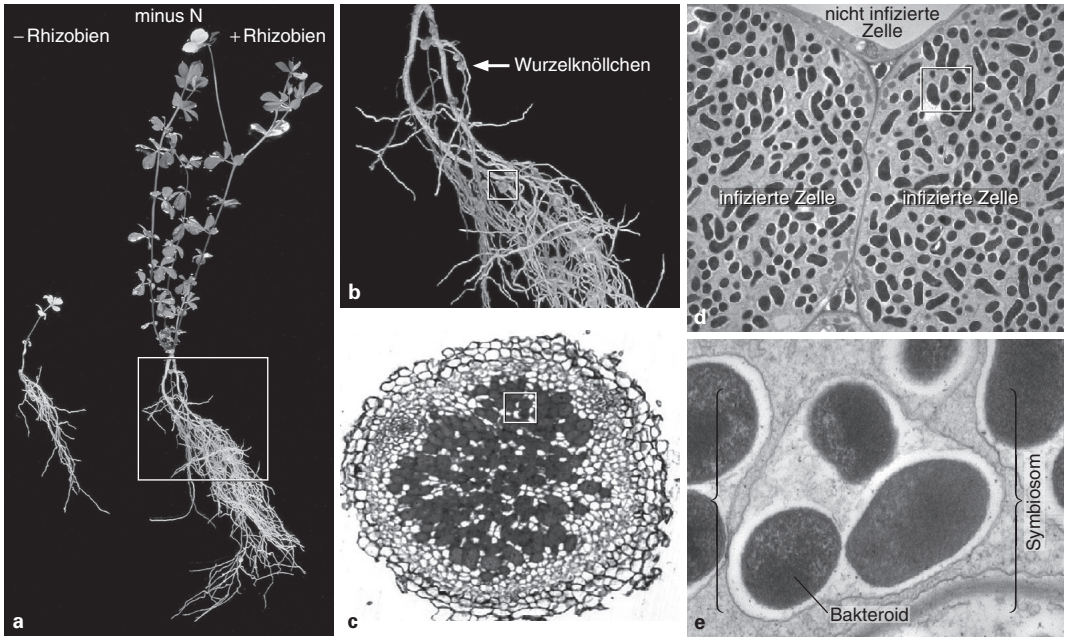

Abb. 1. Die Wurzelknöllchensymbiose der Leguminose *Lotus japonicus* (Hornklee): **a,** Pflanzenentwicklung in Abwesenheit von extern zugefügtem Stickstoffdünger, links ohne und rechts mit Rhizobien; **b,** Wurzelsystem mit Wurzelknöllchen; **c, d,** Querschnitt durch ein Wurzelknöllchen; **e,** Symbiosomen in einer Wurzelknöllchenzelle: organellenartige Strukturen, die aus Bakteroiden und der sie umschließenden pflanzlichen Peribakteroidenmembran bestehen. – Fotos: Thomas Ott.

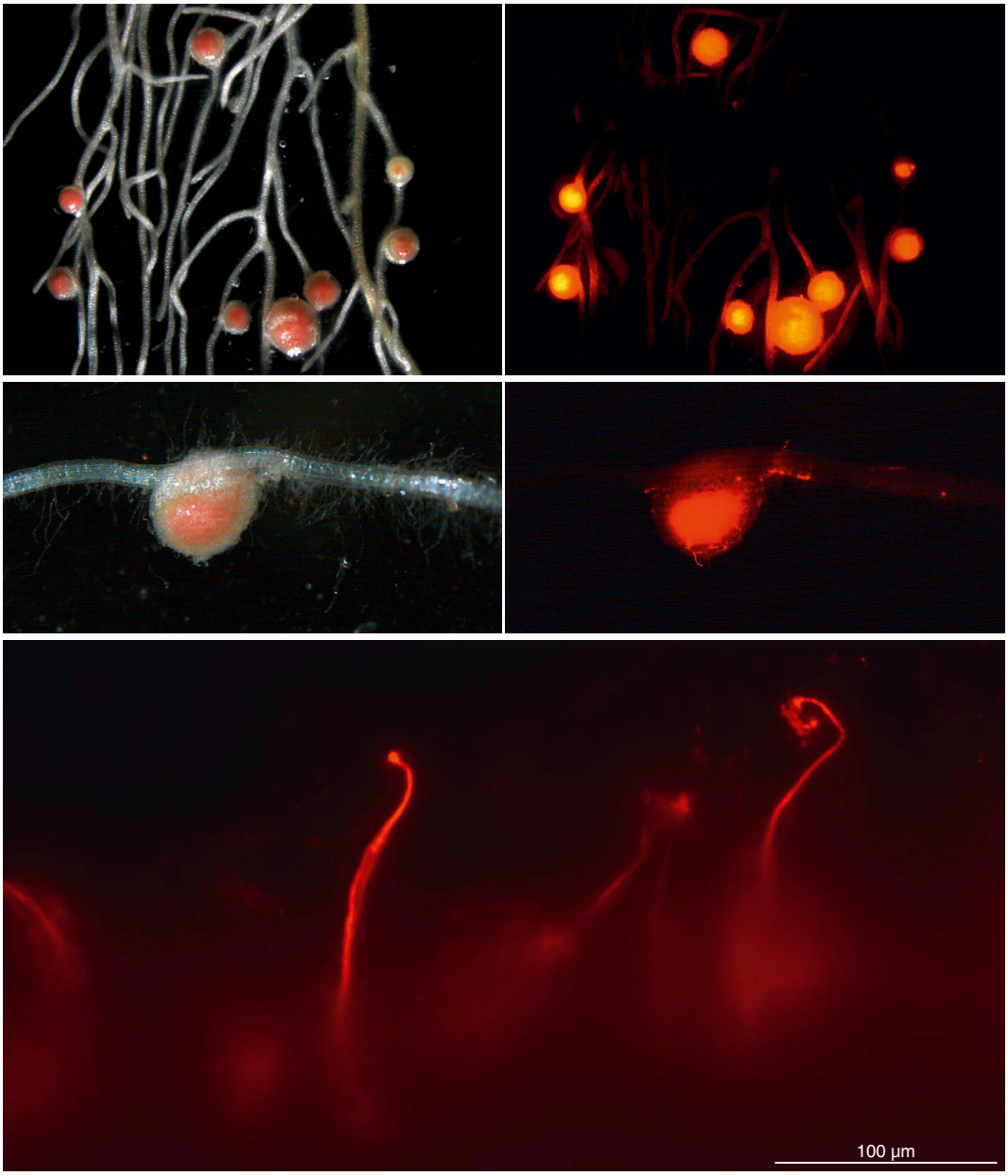

Abb. 2. *Lotus japonicus* (Hornklee): **a,** Wurzelsystem mit Wurzelknöllchen; **b,** Nahaufnahme eines infizierten Wurzelknöllchens; **c,** Nahaufnahme einer Wurzelhaarzelle mit Infektionsschlauch, über den die Bakterien ins Wurzelinnere gelangen. Die Bakterien bilden ein rot fluoreszierendes Protein, mit dessen Hilfe sie sichtbar gemacht werden können. – Fotos: Martina Ried.

derungen. Diese Eigenschaft wurde bereits in den 1950er Jahren entdeckt: Werden Schafe auf Weiden geführt, die stark mit Rotklee (*Trifolium pratense*) bewachsen sind, beginnen die männlichen Schafe Milch zu geben und werden infertil (Bennetts et al. 1946). Darüber hinaus kann die geringere Wahrscheinlichkeit von Asiaten, an Krebs zu erkranken, zumindest teilweise auf den

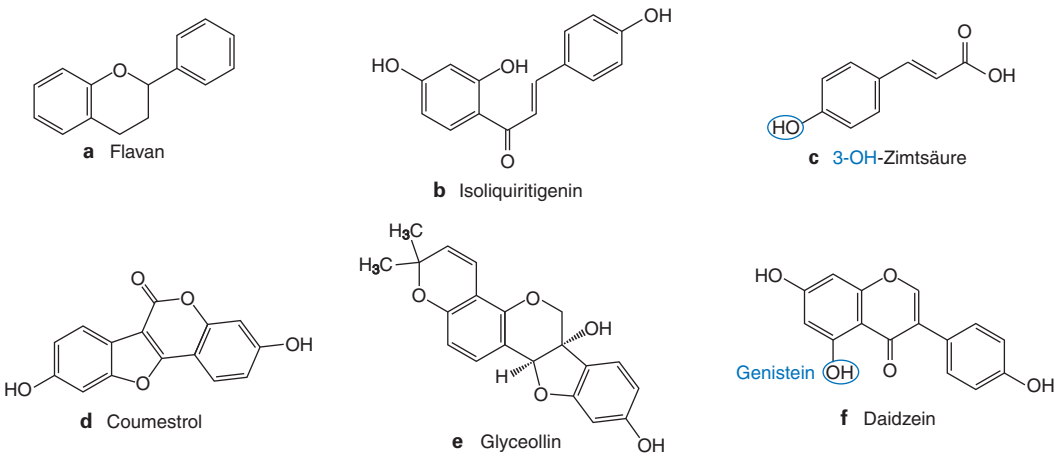

Abb. 3. Strukturformeln von **a,** Flavan (Grundstruktur der Flavonoide), **b,** Isoliquiritigenin, **c,** Zimtsäure und 3-OH-Zimtsäure, **d,** Coumestrol, **e,** Glyceollin, **f,** Daidzein, Genistein.

regelmäßige Verzehr von Sojabohnenkeimlingen zurückgeführt werden – auch bei denjenigen, die nicht mehr in Asien wohnen, aber nur dann, wenn sie den Sojasprossenkonsum auch außerhalb ihres Herkunftslandes weiterverfolgen (Douglas et al. 2013). Allerdings wird dieser krebshemmende Effekt mittlerweile auch Peptiden aus Sojasprossen zugesprochen (Kim et al. 2000). Coumestrol findet man in sehr hoher Konzentration im Exsudat von Sojabohnen; obwohl es für Menschen und Tiere eine Bedeutung hat (s. o.), reagieren die Rhizobien kaum darauf.

Eine dritte Klasse niedermolekularer Substanzen aus der Gruppe der Flavonoide wirkt als Phytoalexin. Phytoalexine sind pflanzeneigene Abwehrstoffe, die typischerweise von der Pflanze gebildet werden, wenn diese von einem pathogenen Mikroorganismus befallen wird, und die zur Hemmung oder zum Abtöten von Mikroorganismen dienen. Bei der Sojabohne ist dies Glyceollin (Abb. 3e), das die Atmungskette (Komplex I) sogar im kompatiblen Symbosepartner *B. japonicum* hemmt (Parniske et al. 1991). Die Flavonoide der Sojabohne können also einerseits die symbiontischen Bakterien aktivieren, andererseits können sie diese jedoch auch über eine Hemmung der Atmungskette abtöten (Parniske et al. 1991, Kape et al. 1992). Glyceollin wirkt also antibiotisch und ist für Rhizobien toxisch. Werden die Rhizobien allerdings mit sehr niedrigen Konzentrationen von Isoliquiritigenin oder Daidzein (Abb. 3f) inkubiert, bevor sie dem Glyceollinexsudat ausgesetzt werden, so werden sie resistent gegenüber der antibiotischen Wirkung.

Tab. 1. Wirkung von Flavonoiden bzw. deren Vorstufen, die im Wurzelexsudat der Sojabohne vorkommen, auf den Mikrosymbionten *Bradyrhizobium japonicum*; Strukturformeln s. Abb. 3. – Daten aus Kape et al. (1991, 1992), Parniske et al. (1991).

Flavonoid oder Vorstufe	Chemoattraktant	Aktivator von *nod*-Genen	Aktivator von Phytoalexinresistenz	Antimikrobielle Aktivität
Zimtsäure	+++	–	–	
3-OH-Zimtsäure	+++	+	–	
Isoliquiritigenin	–	+++	+++	
Daidzein, Genistein	–	+++	+++	
Coumestrol	–	+	–	
Glyceollin	–	–	+	+++

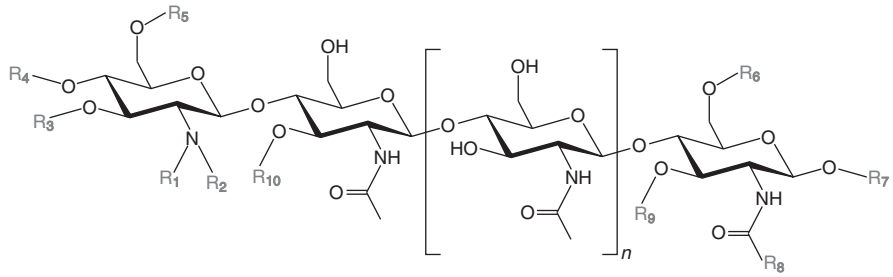

Abb. 4. Strukturformel des Grundgerüstes des Nod-Faktors; R1: Fettsäure, R2–R10: variable Gruppen, die die Wirtsspezifität determinieren.

Flavonoide werden entlang der Wurzel nicht homogen gebildet und exsudiert. Lässt man Wurzeln auf Nitrozellulosefiltern wachsen, welche die exsudierten Flavonoide binden, und behandelt die Flavonoide mit einem Fluoreszenzfarbstoff, lassen sich räumliche und zeitliche Muster der Flavonoidexsudation in die Rhizosphäre erkennen (Cesco et al. 2010). Werden Baumwolldochte an verschiedenen Stellen einer wachsenden Wurzel positioniert und nach einiger Zeit auf gebundene Flavonoide untersucht, lässt sich ebenfalls erkennen, dass unterschiedliche Bereiche der Wurzel ganz unterschiedliche Flavonoidmuster exsudieren (Kape et al. 1991). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in der Rhizosphäre ein komplexes, zeitlich und räumlich sehr stark differenziertes Kommunikationsmuster zwischen Wurzel und Symbiont ausgeprägt ist.

Rhizobien-Signalmoleküle: der Nod-Faktor

Isoliquiritigenin aktiviert *nod*-Gene in *B. japonicum*. Dies wiederum führt zur Bildung von speziellen Enzymen, die zum Bau des Nod-Faktors (Abb. 4) benötigt werden. Da dessen Synthese relativ aufwändig ist, macht es durchaus Sinn, dass er nur dann vom Rhizobium gebildet wird, wenn das Bakterium die direkte Anwesenheit einer kompatiblen Wirtspflanze anhand der von dieser ausgesendeten Flavonoide wahrgenommen hat. Nachdem mehrere Labore über viele Jahre hinweg versucht haben, die Struktur des Nod-Faktors aufzuklären, konnte diese 1990 endlich in einem entscheidenden Nature-Artikel beschrieben werden.

Beim Nod-Faktor handelt es sich um ein so genanntes Lipo-chito-Oligosaccharid (LCO). Die Grundstruktur des Nod-Faktors als wichtiges symbiontisches Signal besteht aus einem *N*-Acetylglucosamin-Tetra- bzw. -Pentamer (Lerouge et al. 1990). Im Verlauf der Co-Evolution haben sich sehr spezifische Paarungen zwischen Leguminosen und den dazugehörigen Rhizobien entwickelt. Die Wirtsspezifität wird dabei durch die spezifischen Dekorationen bestimmt, die durch die Rhizobien an dem *N*-Acetylglucosamin-Rückgrat des Nod-Faktors angebracht werden. Dadurch wird der jeweilige Nod-Faktor nur von den Nod-Faktor-Rezeptoren (s. u.) einer kompatiblen Wirtspflanze erkannt. Es handelt sich beim Nod-Faktor also um eine Struktur, die von unterschiedlichen Leguminosen durch die Ausstattung mit unterschiedlichen Nod-Faktor-Rezeptoren unterschiedlich gut wahrgenommen wird (Broughton & Perret 1999). Die Perzeption des Nod-Faktors durch die Wirtspflanze ist zwingend nötig, um in dieser symbioserelevante Reaktionen auszulösen und so die Infektion mit Rhizobien sowie die Ausbildung von Wurzelknöllchen voranzutreiben.

Setzt man die Wirtspflanze im Labor einem passenden Nod-Faktor aus, wird dadurch in der Pflanze eine symbiontische Signaltransduktion aktiviert. Bereits nach wenigen Minuten setzt als eine der ersten physiologischen Reaktionen der Wurzel das so genannte Kalzium-Spiking ein, das rhythmische Konzentrationsänderungen des Kalziums im Zellkern des Wurzelhaares bezeichnet. Diese können mit einer Frequenz von ca. 1/min mehrere Stunden andauern, jedoch nur solange, bis der Nod-Faktor entfernt wird (Ehrhardt et al. 1996). In der wirklichen Interaktion sind diese Kalzium-Spikes auf ein kleines, definiertes Zeitfenster begrenzt und die Profile der Kalziumantwort von direkt benachbarten Zellen

sind sehr unterschiedlich. Das Fortschreiten des Infektionsschlauches im Gewebe bestimmt die Auswirkungen auf das Kalzium-Spiking in den umliegenden Zellen: Nur diejenigen Zellen, die kurz davor stehen, den Infektionsschlauch aufzunehmen, antworten mit dieser Signatur. Sobald der Infektionsschlauch in die Zelle eingedrungen ist, geht die Frequenz zurück (Sieberer et al. 2012).

2011 überraschte eine Publikation in Nature mit der Beschreibung von LCOs, die aus Kulturen von AM-Pilzen isoliert wurden. Demzufolge könnte es also sein, dass AM-Pilze wie Rhizobien mit Hilfe von LCOs mit ihrer potenziellen Wirtspflanze kommunizieren (Maillet et al. 2011). Aber auch einfache, undekorierte *N*-Acetylglucosamin-Tetramere, die in Pilzsporenexsudaten von AM-Pilzen zu finden sind, können Kalzium-Spiking in Wurzelzellen auslösen. Deshalb werden Chitintetramere derzeit als gleichwertige Kandidaten für die symbiontischen Signalmoleküle der AM-Pilze betrachtet (Walker et al. 2000, Chabaud et al. 2011, Gutjahr & Parniske 2013, Sun et al. 2015).

Erkennung von symbiontischen Bakterien und Pilzen durch die Pflanze

Die Entdeckung, dass in Leguminosen so genannte Lysin-Motiv (LysM)-Rezeptorkinasen in der Plasmamembran für die Rezeption des Nod-Faktors verantwortlich sind, war eine zentral wichtige Entdeckung, die zu Publikationen in Science und Nature geführt hat (Limpens et al. 2003, Madsen et al. 2003, Radutoiu et al. 2003). Diese Rezeptorkinasen bestehen im extrazellulären Bereich üblicherweise aus drei LysM-Domänen und im intrazellulären, zytoplasmatischen Bereich aus einer Proteinkinase (Abb. 5a). LysM-Domänen tragen eine Furche, in die das *N*-Acetylglucosamin-Oligomer binden und damit eine Dimerisierung der Rezeptormoleküle konzeptionell vermitteln kann (Liu et al. 2012).

Eine spannende Frage ist, wie Pflanzen zwischen potenziellen Symbiosepartnern und pathogenen Mikroorganismen unterscheiden können. *N*-Acetylglucosamin kommt nicht nur im Nod-Faktor, sondern auch in der Zellwand der Pilze vor, die aus Chitin besteht, sowie im Peptidoglykan der Zellwand der Eubakterien. Sowohl Chitinoligomere als auch Peptidoglykan zählen zu den PAMPs (pathogen-associated molecular patterns), die von Pflanzen durch LysM-Rezeptoren erkannt werden und eine Abwehrreaktion auslösen, während die LCOs von Rhizobien oder AM-Pilzen, die ebenfalls von LysM-Rezeptoren erkannt werden, symbioserelevante Prozesse aktivieren (Antolín-Llovera et al. 2014a). Aufgrund der extrem gegensätzlichen Antworten der Pflanzenzelle auf Pathogene und Symbionten liegt die Vermutung nahe, dass bei den unterschiedlichen Erkennungsprozessen verschiedene Rezeptoren involviert sind.

Allerdings hat sich kürzlich herausgestellt, dass die beteiligten Rezeptorkomplexe entscheidende Überlappungen aufweisen.[1] In Reispflanzen (*Oryza sativa*) gibt es nur ein Gen, das für eine LysM-Rezeptorkinase codiert, die dem Nod-Faktor-Rezeptor NFR1 sehr eng verwandt ist. Wird dieses Gen mutiert, so wird die Pflanze anfälliger für Pathogene, da sie nicht mehr mit einer Abwehrreaktion auf Chitin reagieren kann; gleichzeitig verliert sie die Fähigkeit, eine AM-Symbiose einzugehen. Das legt nahe, dass diese Rezeptorkinase gleichermaßen für die Induktion von Abwehr und Symbiose wichtig ist (Miyata et al. 2014).

Die genauen Prozesse der Rezeptorkomplexbildung und der daraus resultierenden Signalübertragung sind noch nicht geklärt. Wir stellen uns derzeit vor, dass der ursprünglich für *Lotus* (Hornklee) bzw. Leguminosen als NFR1 und für Reis als CERK1 beschriebene LysM-Rezeptor nur ein Teil eines Rezeptorkomplexes darstellt. Unterschiedliche Signalmoleküle führen wahrscheinlich zur der Ausbildung unterschiedlich zusammengesetzter Rezeptorkomplexe. Diese signalspezifischen Komplexe ermöglichen es dann, die richtigen Signalübertragungswege anzuschalten.

1 Die aktuellen Modellvorstellungen über LysM-Rezeptorkomplexe sind dadurch eingeschränkt, dass die relevante Forschung in so unterschiedlichen Pflanzen wie Leguminosen, Reis und *Arabidopsis* stattgefunden hat und dass in allen diesen Spezies unterschiedlich große Familien der Rezeptorgene vorliegen. Zusätzlich funktioniert CERK1 aus *Arabidopsis* auch unterschiedlich zu der Reis- und Leguminosenversion (Nakagawa et al. 2011). Die nicht kongruenten Datensätze aus verschiedenen Organismen limitieren die Belastbarkeit der aktuellen Modelle.

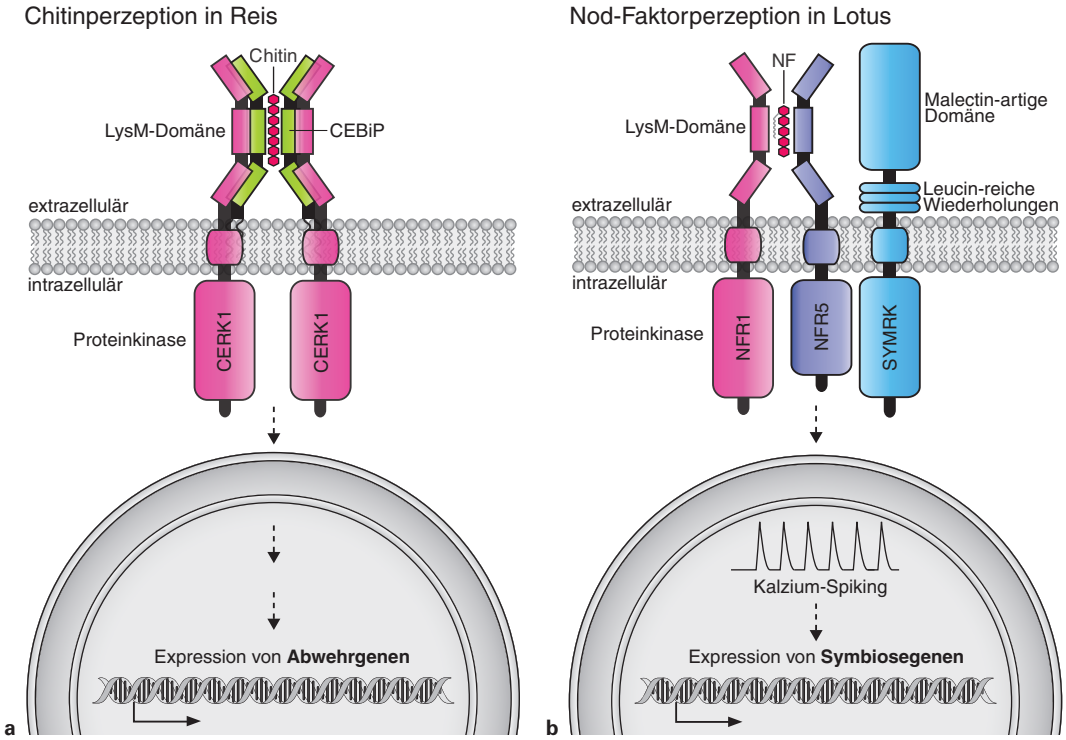

Abb. 5. Rezeptorkomplexbildung und spezifische Antwort der Pflanzenzelle in Abhängigkeit von den Signalmolekülen: schematische Darstellung des Chitin-Rezeptorkomplexes in Reis (**a**) und des Nod-Faktor-Rezeptorkomplexes in *Lotus* (**b**). Erläuterungen s. Text. – Grafik: Martina Ried.

- Der Chitinrezeptorkomplex in Reispflanzen enthält neben der Rezeptorkomponente CERK1 weitere Rezeptoren mit einer höheren Affinität zu Chitin. Wenn der Ligand Chitin vorhanden ist, kommt es zu einer Abwehrreaktion (Abb. 5a).
- Um die AM-Symbiose in Reis einzuleiten, bildet CERK1 andere Rezeptorkomplexe, die für die Symbiose wichtig sind, aber wahrscheinlich keine Abwehrreaktionen auslösen (Miyata et al. 2014, Zhang et al. 2015).
- NFR1 und NFR5 bilden vermutlich einen Komplex mit der Rezeptorkinase SYMRK (Symbiosis Receptor-like Kinase) (Stracke et al. 2002, Markmann et al. 2008, Antolín-Llovera et al. 2014b, Ried et al. 2014), von der bekannt ist, dass sie für die Induktion symbiosespezifischer Antworten in der Pflanzenzelle verantwortlich ist (Abb. 5b).

Die symbiosespezifische Komplexbildung wird vermutlich durch Liganden ausgelöst. Dieses Modell orientiert sich im Wesentlichen an strukturellen und funktionellen Mechanismen pflanzlicher Rezeptorkinasekomplexe, für die bereits Kristallstrukturen vorliegen (Liu et al. 2012, Sun et al. 2013). Für die symbioserelevanten Rezeptoren bedürfen diese noch der Bestätigung durch Experimente. In diesem Modell sitzen die einzelnen Komponenten mit ausreichendem Abstand auf der Membran und werden erst durch die Liganden zusammengeführt. Diese direkten Kontakte ermöglichen dann wahrscheinlich gegenseitige Transphosphorylierungen der Kinasedomänen der interagierenden Rezeptorkinasen sowie weiterer Interaktionspartner. Diese bisher noch unzureichend verstandenen Prozesse sind aber die entscheidenden Schritte zur Signalweiterleitung vom Rezeptor zu zellulären Reaktionen. Jedenfalls gibt es zumindest indirekte Hinweise, dass die Zusammensetzung

des Rezeptorkomplexes tatsächlich dynamisch ist und ihre Ausbildung der entscheidende Schritt bei der Initiation der Signaltransduktion darstellt. Wenn Rezeptorkinasen in erhöhter Konzentration zur Expression gebracht werden, wird die Interaktionswahrscheinlichkeit künstlich erhöht. Dies ermöglicht oder forciert sogar eine Rezeptorkomplexbildung auch in Abwesenheit des Signalmoleküls.

Wir haben getestet, was dies für die darunterliegende Signaltransduktion bedeutet. Die gleichzeitige Überexpression von *NFR1* und *NFR5* in Blättern der tabakverwandten *Nicotiana benthamiana* führt zu spontanem Zelltod, ein typisches Symptom von Abwehrreaktionen der Pflanze (Madsen et al. 2011). Dagegen führt die Überexpression einzelner symbioserelevanter Rezeptorkinasegene (*NFR1*, *NFR5* oder *SYMRK*) in Wurzeln von *Lotus japonicus* dazu, dass die Wurzel in Abwesenheit von Rhizobien spontan Wurzelknöllchen ausbildet. Das ist ein Beweis dafür, dass die Signaltransduktion, die normalerweise für die Symbiose notwendig ist, spontan und in Abwesenheit von Rhizobien angeschaltet wurde. Es gibt dabei keine Hinweise auf Abwehrmechanismen (Ried et al. 2014). Die Ergebnisse in Tabakblättern und Lotuswurzeln zeigen die enge Verwandtschaft der Komplexe, die für Abwehr und Symbiose verantwortlich sind. Allerdings kann die eingangs gestellte Frage immer noch nicht vollständig beantwortet werden. Besonders verwirrend ist die Tatsache, dass das ursprünglich symbiosespezifisch eingestufte Kalzium-Spiking in Wurzelzellen auch durch Chitinoktamere ausgelöst werden kann, also durch ein PAMP, das auch Abwehrreaktionen auslöst. Damit stellt sich die Frage neu, welche Downstream-Signale die entscheidende Spezifität der Antwort vermitteln.

Weltweite Bedeutung der Wurzelknöllchensymbiose

Über das Haber-Bosch-Verfahren produzierter Stickstoffdünger wird heute weltweit eingesetzt, in großen Mengen v. a. aber in den USA, in Europa, Indien und China. Allerdings kommen viele Länder z. B. in Afrika sowohl aus Infrastruktur- als auch aus Geldgründen nicht an ausreichende Mengen Stickstoffdünger, der an den Ölpreis gekoppelt ist, heran. Dies führt zu geringen Ernteerträgen und Nahrungsmittelknappheit. Aus diesem Grund finanziert die Bill & Melinda Gates Foundation seit 2009 ein Projekt namens N2AFRICA (www.n2africa.org). Das Projekt dient der Förderung der biologischen Stickstofffixierungsleistung von Leguminosen in der Landwirtschaft. Mit lokalen Partnern in Ghana, Nigeria, Äthiopien, Uganda und Tansania (core countries) werden die Entwicklung von effizienten Inokulationstechnologien und die entsprechende Ausbildung von Kleinbauern vorangetrieben. In einem zweiten Schritt werden die dabei erzielten Erfolge in die Demokratische Republik Kongo, nach Ruanda, Kenia, Mosambik, Malawi und Zimbabwe weiter verbreitet. Unter anderem wurden zentrale Produktionsstätten für Rhizobieninokulum etabliert. Kleinbauern lernen in dem Projekt, Leguminosensaatgut mit dem passenden Rhizobienstamm zu inokulieren. Das Sojabohnensaatgut wird mit einem rhizobienhaltigen Substrat in Eimern vermischt und anschließend werden die Bohnen von den Kleinbauern einzeln in den Boden gesteckt. Die so ermöglichte Wurzelknöllchensymbiose führte bereits zu massiven Ertragsverbesserungen bei Leguminosen.

Weltweit werden 308 Megatonnen Sojabohnen produziert (2014; FAOSTAT 2016), aber 85 % der Weltproduktion werden zu Mehl und Öl prozessiert. Der durchschnittliche Europäer verbraucht 61 kg Sojabohnenmehl pro Jahr – vor allem über die Tierproduktion. Sojamehl wird in der Tierhaltung in großem Stil benutzt, um Fleisch und alle sonstigen Tierprodukte (z. B. Milch und Eier) zu produzieren. Die großen Importeure von Sojabohnen sind China und Europa; die Hauptlieferanten sind die USA, Brasilien und Argentinien. Da hinter dem Handel mit Soja gewaltige Geldsummen stecken, werden vor allem in Brasilien und Argentinien wertvolle und einzigartige Ökosysteme für den Anbau von Soja zerstört.

Das andere Problem ist, dass wir durch die Sojabohne gewaltige Mengen an Stickstoff nach Europa importieren. Die Tiere können nur einen Teil des im Futter enthaltenen Stickstoffs einbauen, den Rest scheiden sie aus und er kommt bei uns als Dünger auf den Acker, was aufgrund der derzeitig anfallenden Mengen zu massiven Verunreinigungen der Atmosphäre und des Wassers führt. Von einigen Wissenschaftlern wird dies als

eines der größten weltweiten Umweltprobleme angesehen (Sutton et al. 2011).

Was können wir tun? Es hätte bereits sehr positive Auswirkungen, wenn wir unseren Fleischkonsum nur um die Hälfte reduzieren würden. Auch hierfür wäre eine Anpassung des Fleischpreises an die globalen ökologischen Kosten sinnvoll. Ideal wäre es, wenn wir die Leguminosen für die Fleischproduktion verstärkt in Europa anbauen könnten, und damit die ökologischen Konsequenzen der Sojamonokultur für den südamerikanischen Kontinent zu reduzieren.

Danksagung

Für die Zurverfügungstellung der Abbildungen gilt unser Dank Herrn Thomas Ott. Vielen Dank an die Deutsche Forschungsgemeinschaft für die kontinuierliche Förderung unserer Forschung und das European Research Council für die Förderung des Advanced Grants »Molecular inventions underlying the evolution of the nitrogen-fixing root nodule symbiosis«.

Literatur

Antolín-Llovera, M., E. K. Petutsching, M. K. Ried, V. Lipka, T. Nürnberger, S. Robatzek & M. Parniske. 2014a. Knowing your friends and foes – plant receptor-like kinases as initiators of symbiosis or defence. – New Phytologist, 204 (4): 791–802.

Antolín-Llovera, M., M. K. Ried & M. Parniske. 2014b. Cleavage of the SYMBIOSIS RECEPTOR-LIKE KINASE ectodomain promotes complex formation with Nod factor receptor 5. – Current Biology, 24 (4): 422–427.

Bennetts, H. W., E. J. Underwood & F. L. Shier. 1946. A specific breeding problem of shoop on subterranean clover pastures in Western Australia. – Australian Veterinary Journal, 22: 2–12.

Broughton, W. J. & X. Perret. 1999. Genealogy of legume-Rhizobium symbioses. – Current Opinion in Plant Biology, 2 (4): 305–311.

Cesco, S., G. Neumann, N. Tomasi, R. Pinton & L. Weisskopf. 2010. Release of plant-borne flavonoids into the rhizosphere and their role in plant nutrition. – Plant and Soil, 329 (1): 1–25.

Chabaud, M., A. Genre, B. J. Sieberer, A. Faccio, J. Fournier, M. Novero, D. G. Barker & P. Bonfante. 2011. Arbuscular mycorrhizal hyphopodia and germinated spore exudates trigger Ca^{2+} spiking in the legume and nonlegume root epidermis. – New Phytologist, 189 (1): 347–355.

Douglas, C. C., S. A. Johnson & B. H. Arjmandi. 2013. Soy and its isoflavones: the truth behind the science in breast cancer. – Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry, 13 (8): 1178–1187.

Ehrhardt, D. W., R. Wais & S. R. Long. 1996. Calcium spiking in plant root hairs responding to Rhizobium nodulation signals. – Cell, 85 (5): 673–681.

FAOSTAT. 2016. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Statistic Division, Download Data, http://faostat3.fao.org/download/Q/QC/E [zuletzt abgerufen am 05.08.16].

Fournier, J., A. Teillet, M. Chabaud, S. Ivanov, A. Genre, E. Limpens, F. de Carvalho-Niebel & D. G. Barker. 2015. Remodeling of the infection chamber before infection thread formation reveals a two-step mechanism for rhizobial entry into the host legume root hair. – Plant Physiology, 167 (4): 1233–1242.

Gutjahr, C. & M. Parniske. 2013. Cell and developmental biology of arbuscular mycorrhiza symbiosis. – Annual Reviews Cell and Developmental Biology, 29: 593–617.

Hellriegel, H. & H. Wilfarth. 1888. Untersuchungen über die Stickstoffnahrung der Gramineen und Leguminosen. – Beilageheft zu der Zeitschrift des Vereins der Rübenzucker-Industrie des Deutschen Reichs, Bd. 38, 262 S.

Kape, R., M. Parniske & D. Werner. 1991. Chemotaxis and nod gene activity of *Bradyrhizobium japonicum* in response to hydroxycinnamic acids and isoflavonoids. – Applied and Environmental Microbiology, 57 (1): 316–319.

Kape, R., M. Parniske, S. Brandt & D. Werner. 1992. Isoliquiritigenin, a strong nod gene- and glyceollin resistance-inducing flavonoid from soybean root exudate. – Applied and Environmental Microbiology, 58 (5): 1705–1710.

Kim, S. E., H. H. Kim, J. Y. Kim, Y. I. Kang, H. J. Woo & J. J. Lee. 2000. Anticancer activity of hydrophobic peptides from soy proteins. – BioFactors, 12 (1–4): 151–155.

Lerouge, P., P. Roche, C. Faucher, F. Maillet, G. Truchet, J. C. Promé & J. Dénarié. 1990. Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. – Nature, 344 (6268): 781–784.

Limpens, E., C. Franken, P. Smit, J. Willemse, T. Bisseling & R. Geurts. 2003. LysM domain receptor kinases regulating rhizobial Nod factor-induced infection. – Science, 302 (5645): 630–633.

Liu, T., Z. Liu, C. Song, Y. Hu, Z. Han, J. She, F. Fan, J. Wang, C. Jin, J. Chang, J. M. Zhou & J. Chai. 2012. Chitin-induced dimerization activates a plant immune receptor. – Science, 336 (6085): 1160–1164.

Madsen, E. B., L. H. Madsen, S. Radutoiu, M. Olbryt, M. Rakwalska, K. Szczyglowski, S. Sato, T. Kaneko, S. Tabata, N. Sandal & J. Stougaard. 2003. A receptor kinase gene of the LysM type is involved in legume perception of rhizobial signals. – Nature, 425 (6958): 637–640.

Madsen, E. B., M. Antolín-Llovera, C. Grossmann, J. Ye, S. Vieweg, A. Broghammer, L. Krusell, S. Radutoiu, O. N. Jensen, J. Stougaard & M. Parniske. 2011. Autophosphorylation is essential for the in vivo function of the *Lotus japonicus* Nod factor receptor 1 and receptor-mediated signalling in cooperation with Nod factor receptor 5. – The Plant Journal, 65 (3): 404–417.

Maillet, F., V. Poinsot, O. André, V. Puech-Pagès, A. Haouy, M. Gueunier, L. Cromer, D. Giraudet, D. Formey, A. Niebel, E. A. Martinez, H. Driguez, G. Bécard & J. Dénarié. 2011. Fungal lipochitooligosaccharide symbiotic signals in arbuscular mycorrhiza. – Nature, 469 (7328): 58–63.

Markmann, K., G. Giczey & M. Parniske. 2008. Functional adaptation of a plant receptor-kinase paved the way for the evolution of intracellular root symbioses with bacteria. – PLoS Biology, 6: e68; doi:10.1371/journal.pbio.0060068.

Miyata, K., T. Kozaki, Y. Kouzai, K. Ozawa, K. Ishii, E. Asamizu, Y. Okabe, Y. Umehara, A. Miyamoto, Y. Kobae, K. Akiyama, H. Kaku, Y. Nishizawa, N. Shibuya & T. Nakagawa. 2014. The bifunctional plant receptor, OsCERK1, regulates both chitin-triggered immunity and arbuscular mycorrhizal symbiosis in rice. – Plant Cell Physiology, 55 (11): 1864–1872.

Nakagawa, T., H. Kaku, Y. Shimoda, A. Sugiyama, M. Shimamura, K. Takanashi, K. Yazaki, T. Aoki, N. Shibuya & H. Kouchi. 2011. From defense to symbiosis: limited alterations in the kinase domain of LysM receptor-like kinases are crucial for evolution of legume-Rhizobium symbiosis. – The Plant Journal, 65 (2): 169–180.

Parniske, M., B. Ahlborn & D. Werner. 1991. Isoflavonoid-inducible resistance to the phytoalexin glyceollin in soybean rhizobia. – Journal of Bacteriology, 173 (11): 3432–3439.

Peters, N. K., J. W. Frost & S. R. Long. 1986. A plant flavone, luteolin, induces expression of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. – Science, 233 (4767): 977–980.

Radutoiu, S., L. H. Madsen, E. B. Madsen, H. H. Felle, Y. Umehara, M. Grønlund, S. Sato, Y. Nakamura, S. Tabata, N. Sandal & J. Stougaard. 2003. Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases. – Nature, 425 (6958): 585–592.

Ried, M. K., M. Antolín-Llovera & M. Parniske. 2014. Spontaneous symbiotic reprogramming of plant roots triggered by receptor-like kinases. – eLIFE, 3: e03891; doi:10.7554/eLife.03891.

Sieberer, B. J., M. Chabaud, J. Fournier, A. C. J. Timmers & D. G. Barker. 2012 A switch in Ca^{2+} spiking signature is concomitant with endosymbiotic microbe entry into cortical root cells of *Medicago truncatula*. – The Plant Journal, 69 (5): 822–830.

Stracke, S., C. Kistner, S. Yoshida, L. Mulder, S. Sato, T. Kaneko, S. Tabata, N. Sandal, J. Stougaard, K. Szczyglowski & M. Parniske. 2002. A plant receptor-like kinase required for both bacterial and fungal symbiosis. – Nature, 417 (6892): 959–962.

Sun, Y., L. Li, A. P. Macho, Z. Han, Z. Hu, C. Zipfel, J.-M. Zhou & J. Chai. 2013. Structural basis for flg22-induced activation of the *Arabidopsis* FLS2-BAK1 immune complex. – Science, 342 (6158): 624–628.

Sun, J., J. B. Miller, E. Granqvist, A. Wiley-Kalil, E. Gobbato, F. Maillet, S. Cottaz, E. Samain, M. Venkateshwaran, S. Fort, R. J. Morris, J.-M. Ané, J. Dénarié & G. E. D. Oldroyd. 2015. Activation of symbiosis signaling by arbuscular mycorrhizal fungi in legumes and rice. – The Plant Cell, 27 (3): 823–838.

Sutton, M. A., O. Oenema, J. W. Erisman, A. Leip, H. van Grinsven & W. Winiwarter. 2011. Too much of a good thing. – Nature, 472 (7342): 159–161.

Walker, S. A., V. Viprey & J. A. Downie. 2000. Dissection of nodulation signaling using pea mutants defective for calcium spiking induced by nod factors and chitin oligomers. – Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 97 (24): 13413–13418.

Zhang, X., W. Dong, J. Sun, F. Feng, Y. Deng, Z. He, G. E. Oldroyd & E. Wang. 2015. The receptor kinase CERK1 has dual functions in symbiosis and immunity signalling. – The Plant Journal, 81 (2): 258–267.

Diskussion

T. Wichard: Die Stickstofffixierung wird unter Umständen durch Metalle limitiert, die aus dem Medium oder der Umwelt aufgenommen werden müssen, z. B. Molybdän und Eisen. Inwieweit spielt dieser Aspekt eine Rolle bei der Einschätzung, ob die Sojabohne bzw. Leguminosen allgemein erfolgreich in bestimmten Regionen angepflanzt werden können, in denen diese Elemente evtl. nicht unbedingt bioverfügbar sind und damit limitierend wirken?

M. Parniske: Natürlich unterscheiden sich Anbauflächen erheblich in ihrer chemischen Zusammensetzung und es kommt auf den Gehalt des Bodens an, welches dieser Elemente zuerst limitierend wirkt. Eisen ist für viele lebenswichtige Prozesse unverzichtbar und ist deshalb für alle Kulturpflanzen ein essenzielles Element. Molybdän ist besonders wichtig für das Stickstoff fixierende Enzym der symbiontischen rhizobiellen Bakterien, die Nitrogenase, aber auch essenziell für die Nitratreduktase der Pflanzen. Ein Molybdänmangel wirkt sich deshalb negativ auf die Stickstoffversorgung von Pflanzen aus.

M. Hilker: Sie haben erwähnt, dass Rhizobakterien, wenn sie zuvor bestimmten Flavonoiden exponiert waren, resistenter gegenüber dem Phytoalexin Glyceollin sind. Ist bekannt, wie diese Resistenz vermittelt ist und wie lange der Zeitraum sein darf zwischen der vorherigen Exposition und der Glyceollin-Exposition? Anders formuliert: Wie lange »merkt« sich ein Bakterium die vorherige Exposition?

M. Parniske: Die Länge dieses Zeitraums haben wir nicht untersucht. Aber resistente Bakterien wachsen in Gegenwart des Phytoalexins über mehrere Tage im Flüssigmedium. Zur ersten Frage: Das Target, der Komplex 1 der Atmungskette, wird nicht in seiner Sensitivität verändert und auch die Durchgängigkeit der Membransysteme bleibt gleich. Auch blieb die Glyeollinkonzentration in Gegenwart der Bakterien unverändert. Es bleibt also eigentlich nur ein gezielter Transport des Antibiotikums aus der Zelle als möglicher Resistenzmechanismus. Vor einigen Jahren wurde ein durch Isoflavonoide induzierbarer Efflux-Transporter in *Agrobacterium tumefaciens* identifiziert.[2] Flavonoidinduzierbare Phytoalexin-Transporter sind mir bisher nicht bekannt, könnten aber potenziell Phytoalexine aus der Zelle herausschleusen und so die beobachtete Resistenz vermitteln.

M. Matern: Im Rahmen des Lebensmittelgesetzes gibt es eine Genverordnung, die speziell für Soja von großer Bedeutung ist. Könnten Sie kurz darauf eingehen, ob genveränderte Sojapflanzen dieselben Probleme verursachen wie nicht veränderte?

M. Parniske: Die überwältigende Mehrheit der weltweit angebauten Sojapflanzen sind transgen und damit auch das nach Europa importierte Soja, aber die ökologischen Konsequenzen, wie ich sie geschildert habe, haben nichts mit GMO, d. h. gentechnisch veränderten Organismen, zu tun. Fleischkonsum in Europa und die dafür nötige Tierproduktion erfordern den Import von proteinhaltigen Futtermitteln, allen voran die Sojabohne aus Südamerika. Ob diese transgen sind oder nicht, spielt für die Dimension der sich aus der Fleischproduktion ergebenden globalen Konsequenzen keine Rolle (Klimawandel, Vernichtung von Ökosystemen in Südamerika, Algenblüten im Meer mit daraus resultierenden Todeszonen usw.). Die einzige Möglichkeit besteht darin, den Fleischkonsum auf ein nachhaltiges Maß zu reduzieren.

2 Palumbo, J. D., C. I. Kado & D. A. Philips. 1998. An isoflavonoid-inducible efflux pump in *Agrobacterium tumefaciens* is involved in competitive colonization of roots. – Journal of Bacteriology, 180(12): 3107–3113.