

*Aus dem Institut für Pflanzenpathologie und Pflanzenschutz  
der Georg-August-Universität Göttingen*

**Feinstruktur  
unterschiedlicher Zellwandreaktionen im Blattparenchym  
anfälliger und resistenter Rüben (*Beta vulgaris* L.)  
nach Infektion durch *Cercospora beticola* Sacc.**

Von

F. FEINDT, K. MENDGEN und R. HEITEFUSS

*Mit 17 Abbildungen*

*Eingegangen am 3. Oktober 1980*

Die Keimung der Sporen von *Cercospora beticola* auf der Oberfläche des Rübenblattes, das Wachstum der Hyphen und deren Eindringen durch die Spaltöffnung in das Blattinnere wurde von verschiedenen Autoren untersucht (POOL und MCKAY 1916, VESTAL 1933, RATHAIAH 1977, FEINDT *et al.* 1981). Dabei wurden auf Blättern von anfälligen und resistenten Rüben keine Unterschiede beobachtet, die als Ursachen der Resistenz gedeutet werden könnten. Alle Versuche weisen darauf hin, daß sich die Resistenzreaktionen bei den von uns untersuchten Rüben erst im Blattinneren deutlich ausprägen (FEINDT *et al.* 1981).

In der vorliegenden Arbeit wird daher der weitere Infektionsverlauf im Blattparenchym verfolgt, um die Reaktionen des infizierten Gewebes bei Kombinationen unterschiedlicher Anfälligkeit und den möglichen Zeitpunkt zu erfassen, an dem Unverträglichkeitsreaktionen einsetzen.

Cytologische Untersuchungen dieser Art erschienen uns notwendig, weil in zahlreichen physiologisch-biochemischen Arbeiten bisher keine gesicherten Korrelationen zwischen der Anwesenheit oder Bildung pilzhemmender Substanzen im Gewebe und der Resistenz festgestellt werden konnten (MARTIN 1977). Elektronenmikroskopische Untersuchungen, in denen die Nekrotisierung der Zellen ausführlich beschrieben wird, liegen für das Wirt-Parasit-Verhältnis von *Cercospora beticola* im Rübenblatt bisher nur für eine verträgliche Kombination vor (STEINKAMP *et al.* 1979).

Die vorliegende Arbeit vergleicht die Reaktionen der Wirtszelle bei anfälligen und resistenten Rübenblättern und legt besonderen Wert auf die Beobachtung der Interaktionen von Pilz und Wirtszellwand zu Beginn des Infektionsverlaufs. Einige Ergebnisse wurden bereits vorgestellt (FEINDT *et al.* 1978).

## Material und Methoden

Die Anzucht der Rüben, *Beta vulgaris* L., und des Pilzes *Cercospora beticola* aus entsprechenden Herkünften erfolgte wie bei FEINDT *et al.* (1981) angegeben.

Für die lichtmikroskopische Untersuchung des infizierten Blattmaterials wurden die Proben mit Lactophenol-Baumwollblau aufgehellt (GERLACH 1969). Die Darstellung erfolgte mit Interferenzkontrastoptik der Firma E. Leitz, Wetzlar.

Für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden, da die Proben einen relativ kleinen Ausschnitt des Blattes darstellen, die Pflanzen zunächst auf ihre Resistenz überprüft. Acht Wochen alte Pflanzen der anfälligen N-Linie und der resistenten CR-Linie wurden mit *C. beticola* infiziert und 15 d.p.i. der Befallsgrad bonitiert. Jeweils drei Pflanzen, die sich in ihrer Anfälligkeit besonders deutlich unterschieden, wurden selektiert und nach weiteren zwei bis vier Wochen Wachstum für den geplanten Versuch verwendet. Nach 4 bis 12 d.p.i. wurden den infizierten Blättern Blattstückchen entnommen, sobald ein leichtes Einsinken der Epidermis sichtbar wurde, d.h. bei den anfälligen Rüben am 4., 5., 6., 8. und 12. d.p.i. und bei den resistenten Rüben am 6., 7., 8. und 12. d.p.i. Die Probenahme und die Fixierung für die Elektronenmikroskopie erfolgte nach MENDGEN (1973), die Einbettung in Epoxidharz nach SPURR (1969).

Die Kontrastierung erfolgte mit 2 % Uranylacetat und 0,1 % Bleicitrat nach REYNOLDS (1963).

Der Polysaccharidnachweis wurde in Anlehnung an THIÉRY und RAMBOURG (1974) an Ultradünnschnitten auf unbefilmten Nickelnetzen durchgeführt:

- a) 30 Minuten Oxydation mit 1 % Perjodsäure
- b) 10 Minuten sorgfältig in dest. H<sub>2</sub>O spülen
- c) 20 bis 30 Minuten Hydrazonbildung mit 1 % Thiosemicarbazid (TSC) in 10 % Essigsäure
- d) jeweils 10 Minuten waschen in 10 %, 5 % und 2 % Essigsäure und dreimal in dest. H<sub>2</sub>O
- e) 30 Minuten auf 1 % Silberproteinlösung im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubieren
- f) mehrmals waschen
- g) 1 bis 5 Minuten fixieren in 5 % Natriumthiosulfat
- h) dreimal in dest. H<sub>2</sub>O spülen.

Perjodsäure oxydiert 1,2-Glycol-, 1-Hydroxy-2-Amino-, 1-Hydroxy-2-Alkylamino- und 1-Hydroxy-2-Keto-Gruppen unter Spaltung der C—C-Bindung zu Aldehydgruppen. Durch anschließende Hydrazonbildung mit Thiosemicarbazid schlägt sich bei Inkubation in Silberproteinat metallisches Silber in Gegenwart von Hydrazon nieder und liefert ein feingranuläres, elektronendichtes Präzipitat. Intensiv reagieren Monosaccharide, ebenfalls intensiv, aber langsamer reagieren Glykogen und Stärke und nur schwach reagieren Oligosaccharide.

Die Auswertung der Präparate geschah im Transmissionselektronenmikroskop (TEM) EM 10 (Zeiss) bei 60 kV.

Für die Kennzeichnung der Abbildungen wurden folgende Abkürzungen verwendet:

C — Chloroplast	M — Mitochondrium
D — Dictyosom	Mb — Microbody
dM — degeneriertes Mitochondrium	N — Nucleus
dZ — dunkle Zone	nC — nekrotisiertes Cytoplasma
eM — extrazelluläres Material	nP — nekrotisierte Parenchymzelle

ER — endoplasmatisches Retikulum	P — Plastoglobulus
G — Glykogen	Pl — Plasmalemma
gZ — graue Zone	Pz — Pilzzellwand
H — Hyphe	S — Stärkekorn
hZ — helle Zone	nS — nekrotisierte Schließzelle
kP — kollabierte Parenchymzelle	Sp — Septum
L — Lomasom	V — Vakuole
sP — geschädigte Parenchymzelle	vM — vesikuläre Membranstruktur
eZ — Epidermiszelle	Wz — Wirtszellwand
A — Atemhöhle	Za — Zellwandanlagerung
Py — Plasmolyseerscheinungen	

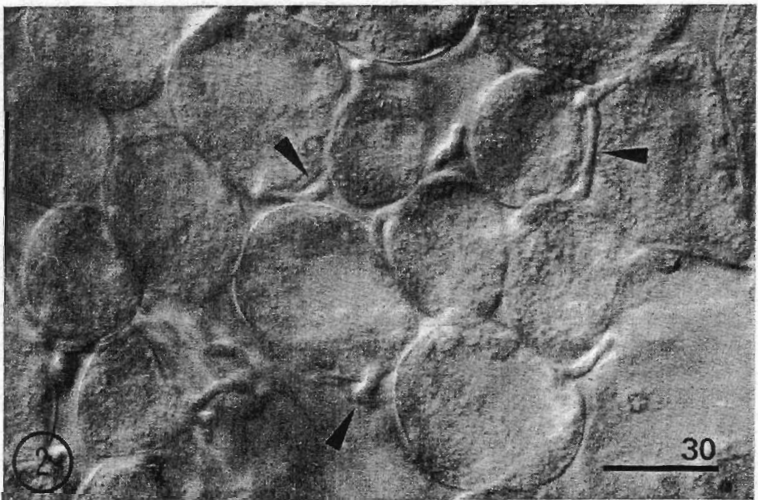


Abb. 1. Durch die Spaltöffnung eindringende Infektionshyphe, die sich in der Atemhöhle verzweigt. • Abb. 2. Rege Verzweigung und intensives interzelluläres Wachstum der Hyphen (Pfeile) im Palisadenparenchym eines anfälligen Rübennblattes. Der Schärfbereich (Totalpräparat) liegt in der Mitte des Palisadenparenchyms

## Ergebnisse

## 1. Der Infektionsverlauf in anfälligem und resistentem Gewebe

Mit der Penetration durch die Spaltöffnung verändern sich Wachstumscharakter und Struktur der Hyphen. Dies wird durch einen größeren Durchmesser und eine intensivere Anfärbung der Infektionshyphne angedeutet (FEINDT *et al.* 1981). Diese Eigenschaften setzen sich bei den im Blattgewebe interzellulär wachsenden Hyphen fort (Abb. 1). Die typische Unterscheidung zwischen a) Appressorium, b) Infektionskeil („infection peg“) und c) Infektionshyphne, wie sie von RATHAIAH (1976) beobachtet wurde, konnten wir nicht bestätigen. Wir fanden vielmehr einen gleitenden Übergang zwischen der Infektionsstruktur über dem Stoma und den Hyphen in der Atemhöhle (Abb. 1). Mit zunehmender Inkubationsdauer (5 bis 8 d.p.i.) beginnt in dem anfälligen Rübenblatt eine rege Verzweigung und ein intensives interzelluläres Wachstum der Hyphen zwischen den Zellen des Palisaden- und Schwammparenchyms (Abb. 2). Schon in diesem Infektionsstadium können einige Parenchym- und Epidermiszellen beobachtet werden, die plasmolysieren oder kollabieren.

Nach intensiver Durchwurzelung des Blattgewebes kommt es schließlich im Bereich der späteren Nekrose zum Zusammenbruch aller Parenchym- und Epidermiszellen. Der Blattfleck erreicht sofort seine endgültige Größe, die bei den anfälligen Rübenblättern etwa 2 bis 4 mm Durchmesser beträgt. Das Hyphenwachstum beschränkt sich auf die mittlere Region des Blattflecks. In

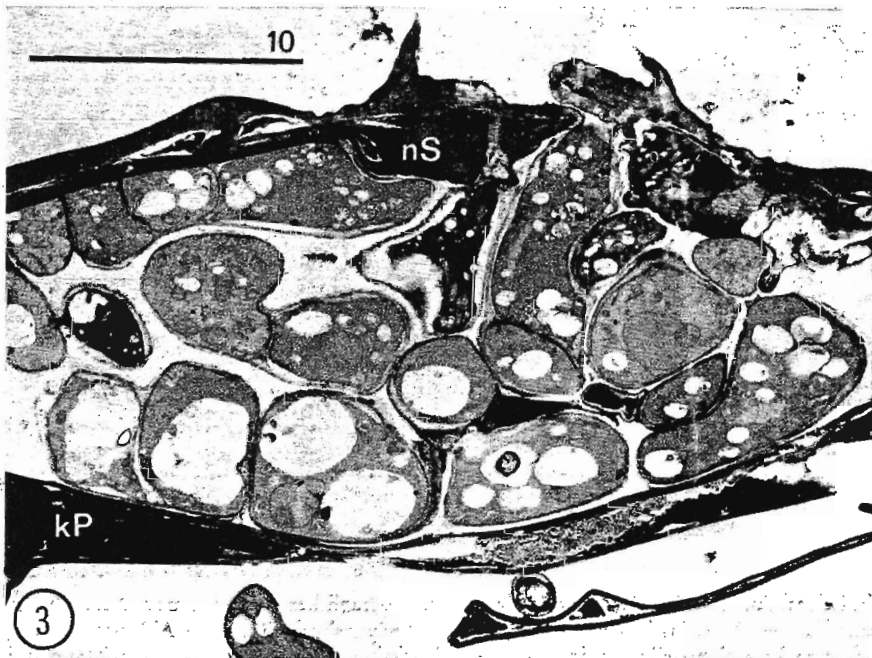


Abb. 3. Querschnitt durch eine relativ kleines Hyphenknäuel in der Atemhöhle des Rübenblattes

einer Entfernung von 0,2 bis 0,3 mm vom Nekrosenrand bis hin zur Nekrosenmitte akkumulieren die Hyphen stromaartig in den ehemaligen oberen und unteren Atemhöhlen zu Hyphenknäueln, sogenannten Stromata oder sklerotikalen Geweben (Abb. 3). In dem unterschiedlich großen Nekrosenrand (0,1 bis 0,5 mm) konnten nur vereinzelt Hyphen beobachtet werden. Stattdessen treten dort runde, dunkelgefärbte Gebilde in den Interzellularen auf, die als extrazelluläres Material bezeichnet werden können (vgl. Abb. 13).

Beobachtungen, die nach einem anfänglich interzellulären Wachstum der Hyphen im späteren Stadium ein intrazelluläres Wachstum beschrieben (POOL und MCKAY 1916, SCHMIDT 1928, STOLZE 1931, CANOVA 1959, BRILLOVA *et al.* 1973, RAUTELA *et al.* 1970) konnten wir bei unserem Material bis zu 12 d.p.i. nicht bestätigen.

Bei den resistenten Rübenblättern setzt sich das etwas verminderte Hyphenwachstum auf der Blattoberfläche älterer Blätter im Blattinneren verstärkt fort und führt bei extremer Inkompatibilität nach 8 bis 12 d.p.i. zu einer Verbräunung weniger Parenchymzellen im Infektionsbereich (Abb. 4). In der Umgebung liegende Parenchym- und Epidermiszellen scheinen kaum geschädigt zu sein. Zwischen den Zellen konnten jedoch zahlreiche osmiophile

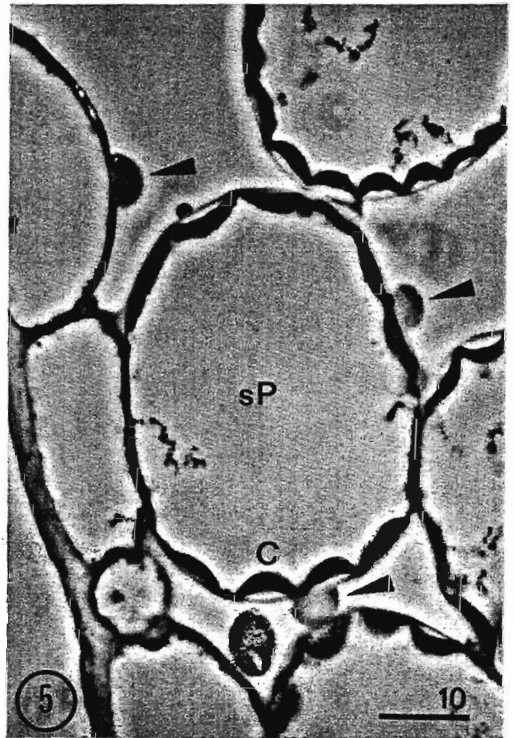
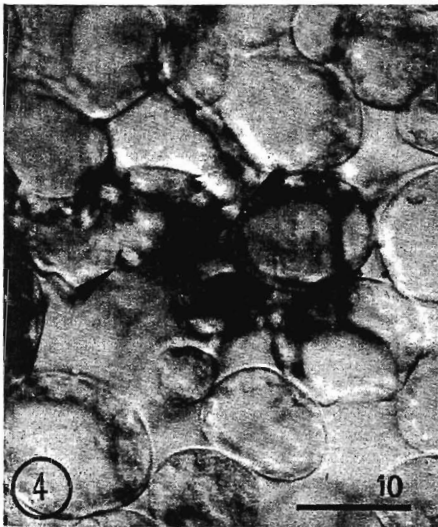


Abb. 4. Verbräunung der Parenchymzellen bei unverträglicher Reaktion und Auftreten von extrazellulärem Material in den Interzellularen (Pfeile), Totalpräparat. • Abb. 5. Querschnitt durch eine Infektionsstelle bei inkompatibler Reaktion. Pfeile = osmiophiles Material im Interzellularraum (2  $\mu$ m Dünnschnitt im Phasenkontrast)

Globuli beobachtet werden (Abb. 5). Die Nekrose ist bei extremer Unverträglichkeit nur mikroskopisch sichtbar und stoppt oftmals schon in der Atemhöhle. Die Ausbildung von sklerotikalem Pilzgewebe ist stark reduziert. In kleinen Nekrosen (0,3 mm  $\phi$ ) konnten nur einzelne Hyphen beobachtet werden. Erst in Nekrosen mit 0,4 bis 0,5 mm  $\phi$  wurde vereinzelt schwach ausgeprägtes Pilzstroma gefunden.

Die Unverträglichkeit der resistenten Rübenpflanzen äußert sich also einerseits in einem reduzierten Hyphenwachstum und andererseits in einem verstärkten Auftreten extrazellulären Materials im Interzellularraum des Infektionsbereiches. Damit ist zusätzlich eine verminderte Ausbildung von Stomata verbunden. Unsere Beobachtungen des Infektionsverlaufs bei anfälligen und resistenten Rübenblättern sind auf den beiden Abbildungen 6 und 7 schematisch dargestellt.

Abb. 6. Hyphenwachstum im Blattparenchym bei verträglicher Kombination, 4 bis 7 d.p.i.; mit Pfeilen angedeutet sind die Reaktionen der Parenchymzellen nach Kontakt mit dem Pilz

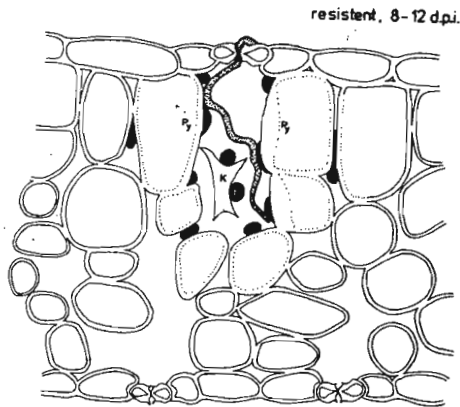
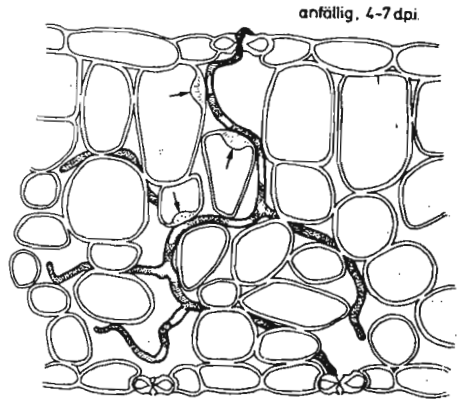


Abb. 7. Reduziertes Hyphenwachstum im Blattparenchym bei unverträglicher Kombination, 8 bis 12 d.p.i. Py = Plasmolyseerscheinung der angrenzenden Parenchymzellen, K = kollabierte Parenchymzelle, E = extrazelluläres Material

## 2. Der Feinbau der Kontaktzone zwischen Wirtszelle und Pilz bei verträglicher Kombination

Bei verträglicher Kombination reagiert die anfällige Pflanzenzelle schon sehr früh auf den Pilzkontakt. Zunächst hebt sich das Plasmalemma von der

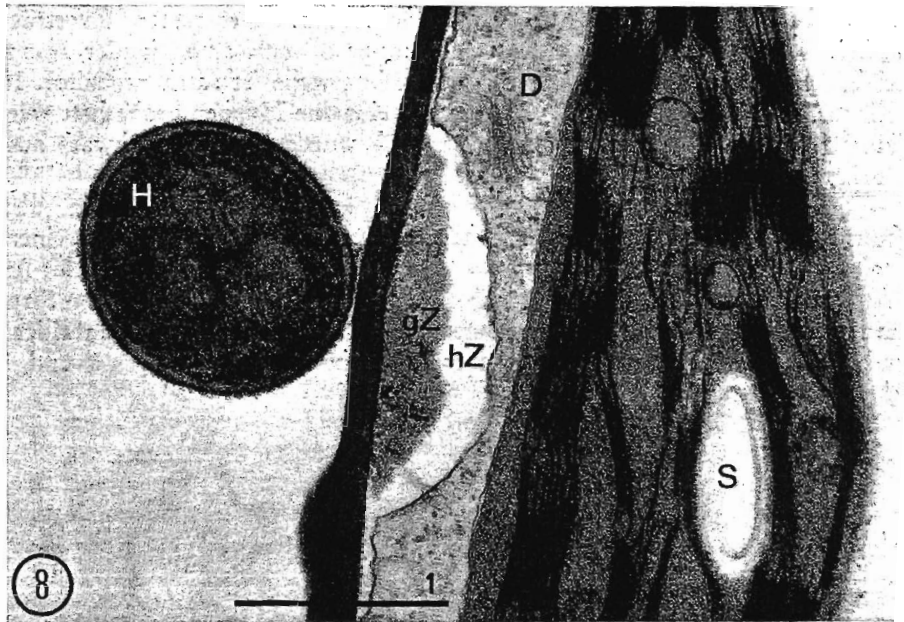


Abb. 8. Eine Hyphe (H) von *C. beticola* in Kontakt mit einer Parenchymzelle. An der Kontaktstelle ist eine Zellwandanlagerung mit einer grauen, elektronendichten (gZ) und einer hellen, elektronendurchlässigen (hZ) Zone zu erkennen

Zellwand ab. In dem entstehenden Raum zwischen Protoplast und Zellwand können unterschiedliche „Zellwandanlagerungen“ beobachtet werden, die oft als „wall-appositions“ bezeichnet werden (BRACKER und LITTLEFIELD 1973). Diese der Pilzhyphe gegenüberliegenden „Wandanlagerungen“ lassen häufig zwei verschiedene Zonen erkennen. Eine der Zellwand direkt angelagerte elektronendichte graugefärbte, amorphe Zone wird von einer elektronendurchlässigen hellen Zone umgeben (Abb. 8).

Die Größe und das Ausmaß der Wandanlagerungen können sehr unterschiedlich sein. Am Anfang der Pathogenese sind sie meistens weniger deutlich ausgeprägt, nehmen aber im weiteren Verlauf an Größe und Elektronendichte zu und bestehen aus einer grauen amorphen Substanz mit dunkleren, osmio-philien Einschlüssen (Abb. 9). Bei stärkerer Vergrößerung (Abb. 10) sind zusätzlich tubuläre oder vesikuläre Einschlüsse erkennbar, die von Membranen umgeben sind. Auch einzelne Membranfragmente konnten beobachtet werden.

Um weitere Informationen über die verschiedenen Zonen der Zellwand-anlagerungen und deren Bestandteile zu erhalten, wurden histochemische Nachweismethoden angewandt: Das Vorhandensein von Kallose wurde fluoreszenzmikroskopisch mit Anilinblau nach ESCHRICH und CURRIER (1964) überprüft. Dabei zeigten sich im Infektionsbereich Kalloseablagerungen, die sich auf die Zellwände und die Zellwandanlagerungen der Parenchymzellen innerhalb der Kontaktzone erstreckten. Die Auflösung des Lichtmikroskops reichte jedoch nicht aus, um eine genauere Lokalisation der Kalloseinlagerungen innerhalb der Kontaktzone des Infektionsbereiches zu geben.

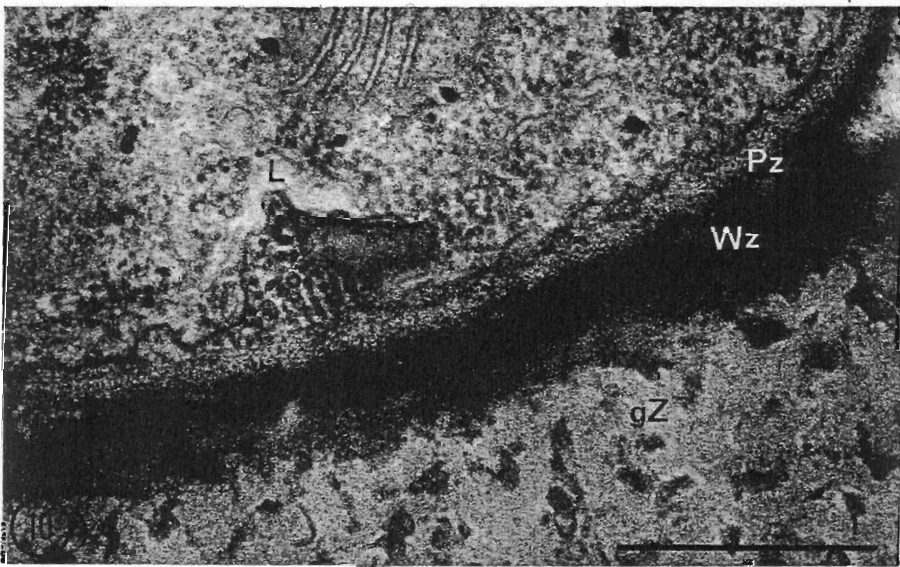
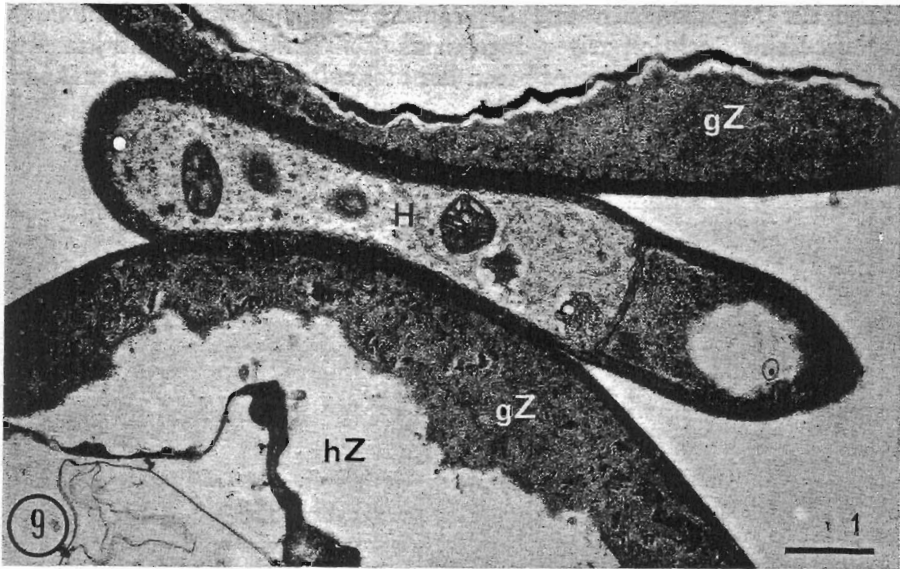


Abb. 9. *Cercospora*-Hyph e zwischen zwei Parenchymzellen mit stark ausgeprägter Zellwandanlagerungen. Die Wandanlagerungen zeigen zwei Zonen — eine graue, elektronendichte Zone mit dunklen, kontrastreichen Einschlüssen und eine helle, elektronendurchlässige Zone. Die helle Zone ist in den beiden Parenchymzellen unterschiedlich groß. • Abb. 10. Die dunklen Einschlüsse der Zellwandanlagerung sind häufig von einer Membran umgeben. In der gegenüberliegenden Hyph e ist ein Lomason (L) erkennbar

Polysaccharide wurden nach THIÈRY und RAMBOURG (1974) an Ultradünnschnitten nachgewiesen. Eine positive Reaktion zeigen die Zellwand des Pilzes und einige Glykogenpartikel in seinem Cytoplasma. In der Wirtszelle haben die Membranen und die Stärkekörner der Chloroplasten, die Mem-

branen der Mitochondrien und des rauhen endoplasmatischen Retikulums reagiert. Keine Reaktion zeigen dagegen die Zellwände der Parenchymzellen (Abb. 11). In dem durch das Abheben des Plasmalemmas entstehenden Raum

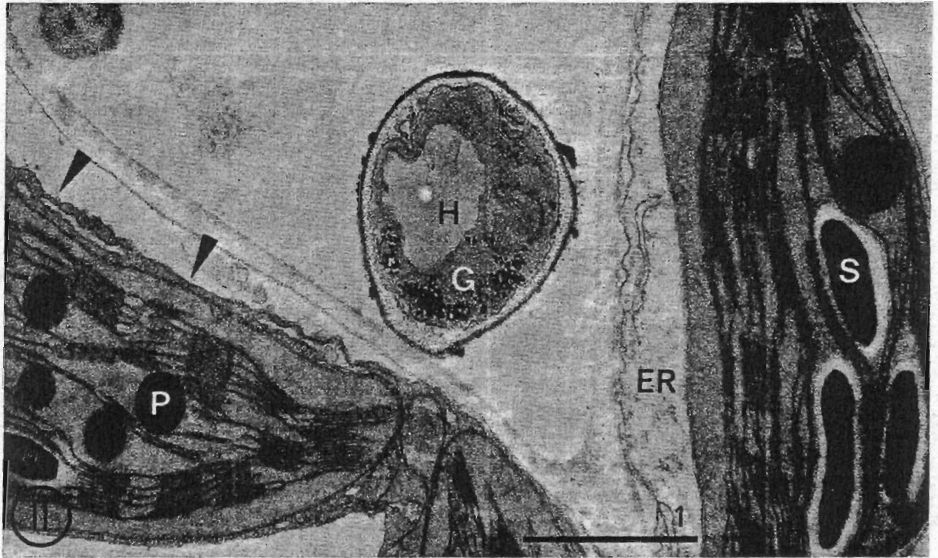


Abb. 11. Bei der histochemischen Nachweismethode auf Polysaccharide reagieren die Stärkekörner (S) in den Chloroplasten (C) und erscheinen sehr kontrastreich und elektronendicht. Eine positive Reaktion lassen ebenfalls erkennen: die Membranen der Chloroplasten, das ER, die Mitochondrien und das Plasmalemma und Glykogenpartikel (G) im Cytoplasma der Pilzhyphe. Die Zellwand der Pilzhyphe zeigt eine positive Reaktion, die Zellwand der Parenchymzellen dagegen nicht. Die linke Parenchymzelle zeigt durch Abheben des Plasmalemmas (Pfeil) bereits eine Reaktion auf den Pilzkontakt. • Abb. 12. Polysaccharidanlagerungen an der Wirtszellwand (Pfeil) nach Pilzkontakt

konnten zu Beginn der Pathogenese Polysaccharidablagerungen an der Zellwand beobachtet werden (Pfeil, Abb. 12).

Mit zunehmender Ausprägung der Zellwandanlagerungen zeigen auch einige Strukturen in der elektronendichten, grauen Zone eine positive Reaktion. Keine Reaktionen erfolgten dagegen in der elektronendurchlässigen, hellen Zone.

Die Kontrolle ohne Perjodsäureoxydation zeigte keine Reaktionen. Auf Grund der verwendeten Methode ist darauf zu schließen, daß in der grauen Zone der Wandanlagerungen Polysaccharide enthalten sind, in der hellen Zone dagegen nicht. Form und Struktur der hellen Zone deuten darauf hin, daß diese Region erst als Folge der Fixierung entstehen könnte.

Einige Zellwandanlagerungen am Nekrosenrand wiesen veränderte Strukturen auf. Sie deuten auf andere Reaktionen der Parenchymzellen hin. Eine kontrastreiche dunkle Zone an der Zellwand wird von der vorher schon besprochenen grauen und hellen Zone umgeben. Gleichzeitig tritt im Interzellularraum schwarzes, osmiophiles Material auf der Außenseite der Parenchymwände auf (Abb. 13), das wir als extrazelluläres Material (eM) bezeichnen. Dieses extrazelluläre Material konnte am Nekrosenrand auch zwischen Pilzhyphe und Parenchymzelle beobachtet werden.

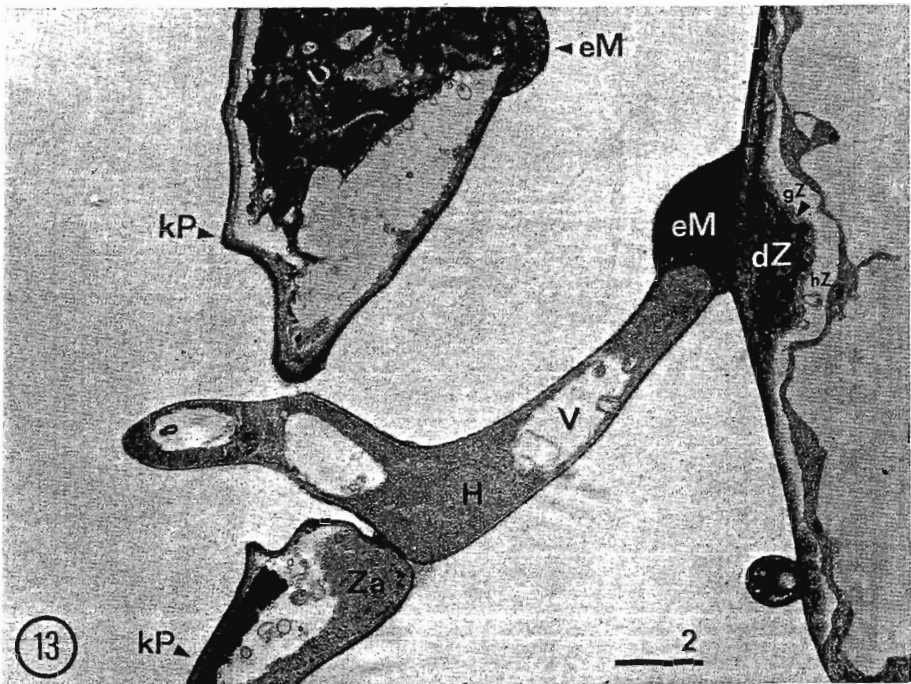


Abb. 13. Nach Ausbildung des Blattflecks bei anfälliger Reaktion sind am Nekrosenrand andersartig strukturierte Wandanlagerungen zu beobachten. Im Inneren der Wirtszelle eine Wandanlagerung mit heller, grauer und dunkler Zone. Auf der Außenseite der Zellwand trennen Hyphe und Wirtswand eine dunkle, elektronendichte Substanz (eM extrazelluläres Material)

Etwa 4 d.p.i. schien die Feinstruktur der Zellen nur wenig gestört. Manchmal wurden jedoch Schäden an den Membranen der Plastiden beobachtet. Einige Tage später war der Zellinhalt vieler Wirtszellen im Bereich der Nekrose kollabiert.

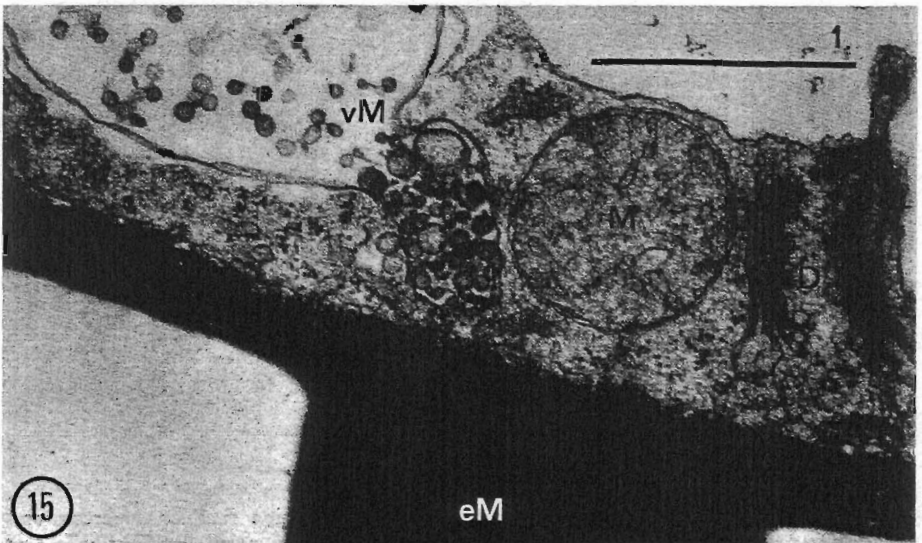
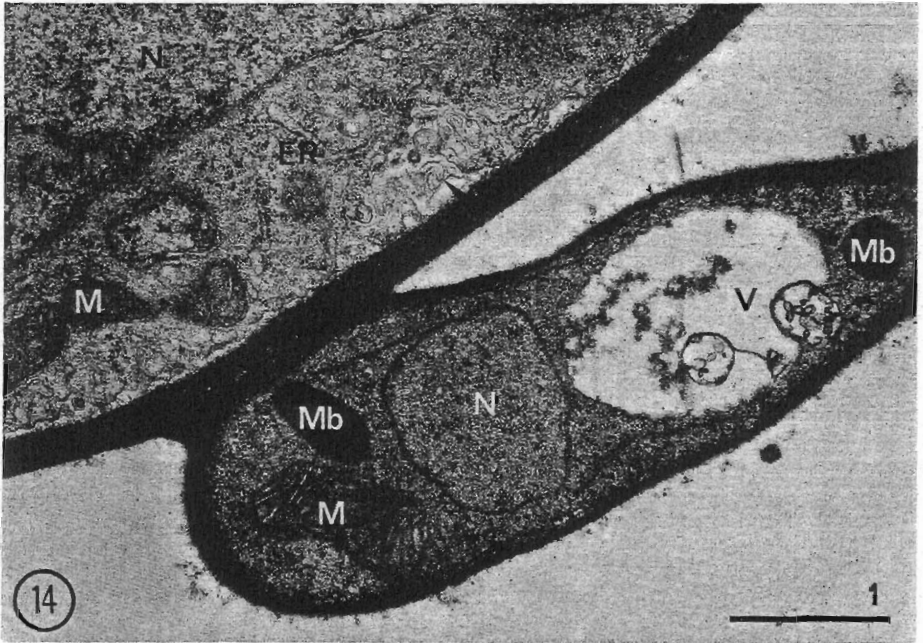


Abb. 14. Veränderungen des Plasmalemmas in der resistenten Parenchymzelle (Pfeil) nach Pilzkontakt. • Abb. 15. Vesikuläre Membranstrukturen und Dictyosom (D) deuten an, daß das extrazelluläre Material (eM) aus der Pflanzenzelle stammen könnte

### 3. Der Feinbau der Kontaktzone bei unverträglicher Kombination

Die Kontaktzone im resistenten Blattgewebe unterscheidet sich in mehrfacher Hinsicht von der im anfälligen Blattparenchym. Bei resistenter Reaktion konnten neben einem verminderten Hyphenwachstum meist nur sehr schwach ausgeprägte oder keine Zellwandinlagerungen in den Parenchymzellen beobachtet werden (Abb. 14). Das Plasmalemma der Wirtszelle scheint aber bereits frühzeitig durch den Pilz eine Veränderung zu erfahren. Es zeigt vesikuläre Membranstrukturen (Pfeil), die mit dem ER in Verbindung stehen (Abb. 14).

Die Wände der Parenchymzellen reagieren auf den Pilzkontakt mit einer Zellwandverdickung (Abb. 16), die mit einer bereits erwähnten Kalloseeinlagerung in diesem Bereich der Kontaktzone in Zusammenhang stehen könnte.

Auf der Außenseite der Zellwand wurde bei inkompatibler Kombination besonders häufig osmiophiles, elektronendichtes, extrazelluläres Material beobachtet, welches sich zwischen der Kontaktzone von Pilz und Parenchymzellwand besonders anhäufte (Abb. 15 und 17), ähnlich wie am Nekrosenrand bei anfälliger Reaktion (Abb. 13).

Das extrazelluläre Material kann im Infektionsbereich auch an anderen Stellen der Zellwand auftreten. Seine Struktur scheint zunächst locker und weniger elektronendicht, erscheint aber im weiteren Verlauf der Pathogenese

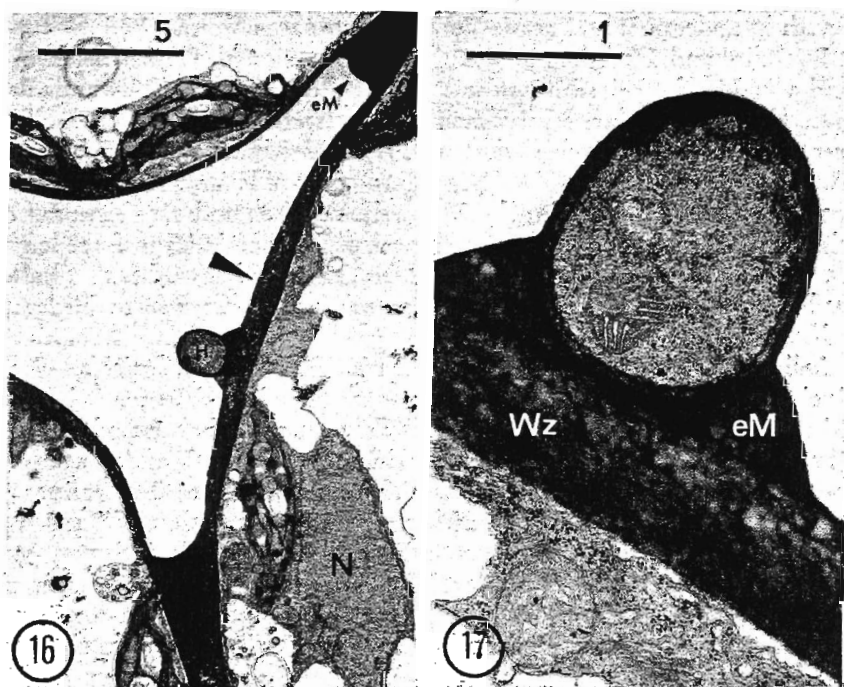


Abb. 16. Zellwandverdickung im Bereich der Kontaktzone (Pfeil). • Abb. 17. Struktur des extrazellulären Materials (eM) zwischen Pilzhyphe und Wirtszellwand (Wz).

zunehmend dunkler und kontrastreicher. Die Herkunft des extrazellulären Materials ist unbekannt; vesikuläre Membranstrukturen und Dictyosomen in unmittelbarer Nähe im angrenzenden Cytoplasmaraum deuten jedoch darauf hin, daß dieses Material von der Pflanzenzelle stammen könnte (Abb. 15). Inwieweit Ausscheidungen des Pilzes an ihrem Aufbau beteiligt sind oder zu Strukturveränderungen beitragen, wenn dieses Material zwischen Hyphe und Parenchymzelle auftritt, kann auf Grund unserer Untersuchungen nicht beurteilt werden. In den Hyphen wurden bei unverträglicher Kombination besonders viele Microbodies beobachtet (Abb. 14).

### Diskussion

Nach dem Eindringen durch eine Spaltöffnung des Rübenblattes wächst *Cercospora beticola* interzellulär. Die Hyphen dringen nicht in die Wirtszelle ein, wie z. B. bei *Colletotrichum lindemuthianum* oder *Botrytis cinera*.

Schon frühzeitig nach Kontakt der Pilzhyphe mit der Wirtszelle können in vielen Fällen Anlagerungen von Polysacchariden im apoplastischen Raum der Kontaktzone zwischen Plasmalemma und Zellwand beobachtet werden. Ähnliche Anlagerungen wurden auch von STEINKAMP *et al.* (1979) beobachtet. Bei weiter fortschreitender Pathogenese nehmen diese Anlagerungen in Größe und Dichte an der Zellwand zu. Derartige Zellwandanlagerungen können als „wall-appositions“ bezeichnet werden (AISR 1976). Wandanlagerungen wurden auch in anderen Wirt-Parasit-Verhältnissen nachgewiesen.

BRACKER und LITTLEFIELD (1973) und VANCE *et al.* (1980) nehmen auf Grund von Membraneinschlüssen und Vesikeln an, daß die Zellwandanlagerungen auf sekretorischen Aktivitäten der Wirtszelle beruhen und eine Toleranzreaktion gegen Pilztoxine oder eine Hypersensitivitätsreaktion darstellen. Sie warnen aber vor einer Verallgemeinerung, Papille und Zellwandanlagerungen nur als Abwehrreaktion der Wirtszelle zu sehen und verweisen auf eine gewisse Ähnlichkeit mancher Wandanlagerungen zu den in Transferzellen von PATE und GUNNING (1972) beschriebenen „Zellwandinwüchsen“ (wall-in-growths), denen man als Ursache eines intensiven Stofftransportes Bedeutung beimißt.

Sollten diese Wandanlagerungen in der Kombination *C. beticola*—*B. vulgaris* eine Resistenzbarriere darstellen, müßten diese in resistenten Wirtszellen im Vergleich zu anfälligen Wirtszellen größere Ausmaße haben und nicht, wie wir beobachteten, schwächer ausgebildet sein. Die größeren Wandanlagerungen könnten in unserem Falle vielmehr die Folge eines stärkeren Transportes von Metaboliten in Richtung Pilz bei anfälliger Kombination sein und Reaktionen zwischen Ausscheidungen des Pilzes (z. B. Enzyme oder Toxine) und Metaboliten der Pflanzenzelle darstellen. Unterschiede in den Reaktionen sind durch unterschiedliche Ausbildung der Wandanlagerungen angedeutet. So zeigten die Wandanlagerungen bei verträglicher Reaktion der Pflanzen eine große graue Zone mit dunklen Einschlüssen, während bei unverträglicher Reaktion diese Zone kleiner erscheint und zusätzlich eine dritte, osmiophile, dunkle Zone auftritt.

Das auffällig bessere Pilzwachstum im anfälligen Rübenblatt im Vergleich zum resistenten Blatt könnte zwar einerseits durch eine unterschiedliche Toxinempfindlichkeit hervorgerufen werden, andererseits aber auch auf einem bereits vorhandenen unterschiedlichen Substratangebot und dessen Zugänglichkeit beruhen.

Die z. B. von uns beobachtete erhöhte Anwesenheit von Microbodies in Hyphen bei resistenter Reaktion könnte auf ein mangelndes Angebot von löslichen Kohlenhydraten deuten. So berichten einige Autoren (siehe MAXWELL *et al.* 1977) von wenigen Microbodies in den Haustorien biotropher Pilze oder in den Hyphen von auf Glukosenährmedium gewachsenen Pilzen, von einer Vielzahl von Microbodies dagegen während der Sporogenese oder in Pilzen, die auf Nicht-Glukose-Nährmedium kultiviert waren. Die Anwesenheit von Microbodies in den Hyphen bei inkompatibler Reaktion und deren Fehlen bei verträglicher Kombination könnte somit auf einem unterschiedlichen Substratangebot im Interzellularraum und einer frühzeitiger einsetzenden Sporogenese beruhen.

Die Verfügbarkeit von Substrat für den Pilz wird wiederum abhängig sein von den Transportmöglichkeiten und -kapazitäten der Pflanzen. HAWKER (1965) und KRIEDEMANN (1966) nehmen an, daß der Mittelstreckentransport der Sucrose apoplastisch über den „free space“ der Zellwand abläuft. Ein geringerer Mittelstreckentransport von Saccharose im Apoplasten bis zum Phloem würde den Ertragsabfall von Rübensorten bei zunehmender *Cercospora*-Resistenz erklären. Hochleistungssorten hätten dagegen einen höheren Saccharosetransport und würden damit ein besseres Nahrungsangebot für den Pilz zur Verfügung stellen. Außerdem fanden SUZUKI und MORTIMER (1973) in jüngeren Blättern einen mehr als doppelt so hohen Zuckergehalt als in älteren Rübenblättern. Wir beobachteten bei jüngeren Rübenblättern besseres Pilzwachstum auf der Blattoberfläche und im Blattinneren (FEINDT *et al.* 1981). Es könnte also ein Zusammenhang zwischen der Anfälligkeit und dem hohen Saccharosegehalt im jungen Rübenblatt bestehen. Auch LAZAROVITS *et al.* (1976) nehmen an, daß bei anfälliger Kombination von *Cladosporium fulvum* und Tomate bis zu Beginn der Sporulation deutliche Anzeichen für ein gutes Nährstoffangebot des Wirts an den Parasiten vorhanden sind. Das Ausbleiben der Sporulation dagegen auf resistenten Pflanzen ist ihrer Ansicht nach auf die schlechte Nährstoffversorgung des Pilzes zurückzuführen.

Im resistenten Pflanzengewebe und am Nekrosenrand bei anfälliger Reaktion (siehe auch STEINKAMP *et al.* 1979) deuten osmiophile extrazelluläre Zellwandanlagerungen auf Abwehrreaktionen der Wirtszelle hin. Morphologisch scheinen die Gegenreaktionen des Pflanzengewebes im Nekrosenrand bei anfälligen Pflanzen und im gesamten Infektionsbereich bei resistenten Pflanzen mehr oder weniger ähnlich zu sein. Die Ausbreitung des Pilzes und das weitere Vordringen der Hyphen könnte durch dieses osmiophile, extrazelluläre Material blockiert werden. Die Herkunft dieses Materials ist unbekannt. Membranstrukturen und Dictyosom in unmittelbarer Nähe des angrenzenden Cytoplasmasaums der Wirtszelle und das Auftreten des extrazellulären Materials an den Zellwänden außerhalb der direkten Kontaktzone

mit dem Pilz lassen jedoch vermuten, daß dieses Material Ausscheidungen der Parenchymzellen sein könnte.

LAZAROVITS *et al.* (1976) fanden sehr ähnliches extrazelluläres Material in Tomatenpflanzen nach Infektion mit *Cladosporium fulvum*. Sie vermuten ebenfalls, daß es sich um Ausscheidungen der Wirtszellen mit phenolischen Bestandteilen handeln müsse. STEINKAMP *et al.* (1979) diskutieren Pektin als Bestandteil der Anlagerungen, Beweise fehlen jedoch. Für phenolische Verbindungen spricht der höhere Gehalt an Dihydroxyphenylalanin (DOPA) bei resistenten Rübensorten nach Infektion (HECKER *et al.* 1975, BRILLOVA *et al.* 1973).

Die Frage, ob sich zwischen den nach Infektion mit *C. beticola* in Rübenblättern auftretenden und von JOHNSON *et al.* (1976) nachgewiesenen Phytoalexinen „Betagarin“ und „Betavulgarin“ mit fungitoxischer Wirkung und dem extrazellulären Material ein Zusammenhang herstellen läßt, ist noch offen. Ein Zusammenhang zwischen dem gehäuften Auftreten extrazellulären Materials am Nekrosenrand bei anfälliger Reaktion, dem Fehlen von Pilzhyphen in diesem Bereich und der fungitoxischen Wirkung dieses Materials ist jedoch denkbar.

Kalloseanreicherung im gesamten Infektionsbereich bei resistenter Reaktion und die phenolischen Bestandteile im extrazellulären Material, die neben der pilzhemmenden Eigenschaft gleichzeitig die Permeabilität und damit das „Nährstoffangebot“ der Wirtszellen sowie die „Nährstoffzugänglichkeit“ für den Parasiten beeinflussen, könnte eine von vielen Erklärungen für das verminderte Pilzwachstum in resistenten Rübenblättern sein.

### Zusammenfassung

Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen über den Infektionsverlauf von *Cercospora beticola* und *Beta vulgaris* L. zeigen unterschiedliche Wirt-Parasit-Reaktionen anfälliger und resistenter Rübensorten. Bei anfälliger Reaktion findet nach dem Eindringen des Pilzes durch die Spaltöffnung ein intensives interzelluläres Wachstum der Hyphen statt. Die Wirtszellen reagieren auf den Pilzkontakt mit einer ausgeprägten Zellwandanlagerung, die aus einer grauen, elektronendichten, Polysaccharid, Membran und Vesikel enthaltenden Zone und einer hellen, elektronendurchlässigen Zone zwischen Wirtswand und Plasmalemma besteht. Pilzwachstum und Sporulation konnten nur in der Nekrosenmitte beobachtet werden. Anreicherung von osmiophilem, extrazellulärem Material, gehemmtes Hyphenwachstum und ausbleibende Sporulation am Nekrosenrand stehen vermutlich im Zusammenhang.

Bei resistenter Reaktion reagieren die Wirtszellen auf den Pilzkontakt teilweise ohne und teilweise mit einer wesentlich kleineren, aber veränderten Zellwandanlagerung, die zusätzlich zu diesen beiden Zonen noch eine sehr dunkle, elektronendurchlässige Zone enthält. Auftreten von extrazellulärem Material im gesamten Infektionsbereich, sowie vermindertes Pilzwachstum und Sporulation lassen hier frühzeitige Abwehrreaktionen der resistenten Pflanzen erkennen.

Ein möglicher Zusammenhang zwischen der Nährstoffversorgung des Pilzes und den Zellwandanlagerungen, ebenso wie zwischen dem gehemmten Pilzwachstum und dem extrazellulären Material wird diskutiert.

### Summary

Fine structure of cell wall reactions in leaves of resistant and susceptible beets (*Beta vulgaris* L.) after infection by *Cercospora beticola*

The infection process of *Cercospora beticola* in resistant and susceptible leaves of *Beta vulgaris* was studied with the light- and electron microscope. In the compatible combination, an intensive intercellular growth of hyphae was observed in the leaf tissue. As soon as 4 d.p.i., host cells at the centre of the lesion reacted by producing a wall apposition between the cell wall and the plasmalemma. The apposition consisted of a grey electron dense zone, sometimes containing membranes and vesicles, and a light zone, possibly an artifact of preparation. About 5—6 d.p.i., host cells collapsed. Fungal growth and sporulation were much more abundant in the centre of the necrotic area. At the edge of the lesion, extracellular, osmiophilic material accumulated in the intercellular spaces. Greatly reduced growth of hyphae and absence of sporulation seemed to coincide with the appearance of this extracellular material.

In the incompatible combination, wall appositions were relatively small and consisted of a lighter and darker shade of grey and an electron transparent area. Abundant extracellular material occurred throughout the infection area. Greatly reduced growth of hyphae and very much reduced sporulation seemed to be a consequence of the accumulation of the extracellular material. A possible relationship between the different types of wall appositions and the nutrition of the fungus is discussed.

Die Arbeit wurde aus Mitteln der Gesellschaft zur Förderung der privaten deutschen Pflanzenzüchtung gefördert.

### Literaturverzeichnis

- AIST, J. R., 1976: Papillae and related wound plugs of plant cells. *Ann. Rev. Phytopath.* 14, 145—163.
- , 1977: Mechanically induced wall appositions of plant cells can prevent penetration by a parasitic fungus. *Science* 197, 568—570.
- BRACKER, C. E., and L. J. LITTLEFIELD, 1973: Structural concepts of host-pathogen interfaces. In: R. J. W. BYRDE and C. V. CUTTING (Eds.), *Fungal Pathogenicity and the Plant's Response*, 159—313. Academic Press, London, New York.
- BRILLOVA, D., O. SLADKA, and A. MICHALIKOWA, 1973: Defensive reactions of the sugar beet after the infection with *Cercospora beticola* Sacc. *Biologia (Prace)* 19, 1—65.
- CANOVA, A., 1959: Ricerche su la biologia e l'epidemiologia della *Cercospora beticola* Sacc. Parte IV. *Ann. Sperim. Agr.* 13, 685—776.
- ESCHRICH, W., and H. B. CURRIER, 1964: Identification of callose by its diachrome and fluorochrome reactions. *Stain Techn.* 39, 303—307.
- FEINDT, F., K. MENDGEN, and R. HEITFUSS, 1978: Different cell wall appositions in susceptible and resistant sugar beets after infection with *Cercospora beticola*. 3rd Intern. Congr. Plant Pathology, München, p. 232.

- , — und —, 1981: Der Einfluß der Spaltöffnungsweite und des Blattalters auf den Infektionserfolg von *Cercospora beticola* bei Zuckerrüben (*Beta vulgaris* L.) unterschiedlicher Anfälligkeit. *Phytopath. Z.* 101, 281—297.
- GERLACH, D., 1969: Botanische Mikrotechnik: Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- HAWKER, J. S., 1965: The sugar content of cell walls and intercellular spaces in sugar-cane stems and its relation to sugar transport. *Austral. J. Biol. Sci.* 18, 959—969.
- HECKER, R. J., E. G. RUPPEL, G. W. MAAG, and D. M. RASMUSON, 1975: Amino acids associated with *Cercospora* leaf spot resistance in sugar beet. *Phytopath. Z.* 82, 175—181.
- JOHNSON, G., D. D. MAAG, D. K. JOHNSON, and R. D. THOMAS, 1976: The possible role of phytoalexins in the resistance of sugarbeet (*Beta vulgaris*) to *Cercospora beticola*. *Physiol. Plant Path.* 8, 225—230.
- KRIEDEMANN, P., 1966: Sugar uptake and translocation in the castor bean seedling. III. An autoradiographic study of the absorption pathway. *Planta* 73, 175—180.
- LAZAROVITS, G., and V. J. HIGGINS, 1976: Histological comparison of *Cladosporium fulvum* race 1 on immune, resistant, and susceptible tomato varieties. *Canad. J. Bot.* 54, 224—234.
- MARTIN, S. S., 1977: Accumulation of the flavonoids betagarin and betavulgarin in *Beta vulgaris* infected by the fungus *Cercospora beticola*. *Physiol. Plant Path.* 11, 297—303.
- MAXWELL, D. P., V. N. ARMENTROUT, and L. B. GRAVES Jr., 1977: Microbodies in plant pathogenic fungi. *Ann. Rev. Phytopath.* 15, 119—134.
- MENDGEN, K., 1973: Feinbau der Infektionsstrukturen von *Uromyces phaseoli*. *Phytopath. Z.* 78, 109—120.
- PATE, J. S., and B. E. S. GUNNING, 1972: Transfer cells. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 23, 173—196.
- POOL, V. W., and M. B. MCKAY, 1916: Relation of stomatal movement to infection by *Cercospora beticola*. *J. Agric. Res.* 22, 1011—1038.
- RATHALAH, Y., 1976: Infection of sugarbeet by *Cercospora beticola* in relation to stomatal condition. *Phytopathology* 66, 737—740.
- , 1977: Stomatal tropism of *Cercospora beticola* in sugarbeet. *Phytopathology* 67, 358—362.
- RAUTELA, G. S., and M. G. PAYNE, 1970: The relationship of peroxidase and orthodiphenol oxidase to resistance of sugarbeets to *Cercospora* leaf spot. *Phytopathology* 60, 238—245.
- REYNOLDS, E. S., 1963: The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 17, 208.
- SCHMIDT, E. W., 1928: Untersuchungen über die *Cercospora*-Blattfleckenkrankheit der Zuckerrübe. *Arb. Zuckerfabrik Kleinwanzleben* 4, 3—40.
- SPURR, A. R., 1969: A low viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J. Ultrastruct. Res.* 26, 31—43.
- STEINKAMP, M. P., S. S. MARTIN, L. L. HOEFERT, and E. G. RUPPEL, 1979: Ultrastructure of lesions produced by *Cercospora beticola* in leaves of *Beta vulgaris*. *Physiol. Plant Path.* 15, 13—26.
- STOLZE, K. V., 1931: Beitrag zur Biologie, Epidemiologie und Bekämpfung der Blattfleckenkrankheit der Zuckerrübe. *Arb. Biol. Reichsanst. Land- und Forstw.* 19, 338—402.
- SUZUKI, M., and D. C. MORTIMER, 1973: Sugar concentration gradient of the sugar beet plant in relation to translocation. *Canad. J. Bot.* 51, 1733—1739.
- THIÉRY, J. P., et A. RAMBOURG, 1974: Cytchimie des polysaccharides. *J. Microscopie* 21, 225—232.
- VANCE, C. P., T. K. KIRK, and R. T. SHERWOOD, 1980: Lignification as a mechanism of disease resistance. *Ann. Rev. Phytopath.* 18, 259—288.
- VESTAL, E., 1933: Pathogenicity, host response and control of *Cercospora* leaf spot of sugar beets. *Iowa Agric. Exp. Sta. Res. Bull.* 168, 43—72.

Anschriften der Verfasser: Dr. F. FEINDT, Dreisenweg 2, D-3354 Dassel-Lüthorst. Prof. K. MENDGEN, Lehrstuhl Phytopathologie, Fakultät für Biologie, Universität Konstanz, D-7750 Konstanz. Prof. R. HEITEFUSS, Institut für Pflanzenpathologie der Universität Göttingen, Grisebachstraße 6, D-3400 Göttingen.