

*Aus dem Institut für Pflanzenpathologie und Pflanzenschutz
der Universität Göttingen*

Feinbau der Infektionsstrukturen von *Uromyces phaseoli*

Von

K. MENDGEN

Mit 13 Abbildungen

Eingegangen am 5. April 1973

Der Infektionsverlauf bei Rostpilzen ist seit den Beobachtungen von DE BARY (1863) bekannt. Später beschreiben WARD (1903) und EVANS (1907) das Appressorium, das für jede Rostart typische substomatäre Vesikel, die Infektionshyphe und das erste Haustorium. Der Vergleich von Sorten unterschiedlicher Resistenz gegenüber dem Schwarzrost zeigte nach Anfärbung Unterschiede in der Reaktion einzelner Zelltypen (ALLEN 1923 a und b). Eine Beschreibung der Feinstrukturen während des Invasionsvorganges scheint zu fehlen. Dies ist aber eine Voraussetzung für weitere Untersuchungen an resistenten Sorten, da Resistenzmechanismen beim Mais schon an der Spaltöffnung (LEATH und ROWELL 1966) oder z. B. bei der Erbse mit der Bildung des ersten Haustoriums einsetzen können (HEATH 1971, HEATH und HEATH 1971, ZIMMER 1965). Die hier vorgelegten Untersuchungen wurden an Bohnenrost [*Uromyces phaseoli* (Pers.) Wint. var. *typica* Arth.] ausgeführt.

Material und Methoden

Buschbohnen (*Phaseolus vulgaris* L., Sorte Favorit) wurden bei 21 °C und etwa 6000 Lux 16 h/Tag im Lichtthermostaten angezogen. Zehn Tage nach der Aussaat wurden die Primärblätter mit einer Uredosporensuspension von *Uromyces phaseoli typica* bestrichen, nachdem die Sporen etwa 30 Minuten in dest. Wasser gespült worden waren. Anschließend wurden die Bohnen 21 Stunden in einem dunklen Thermostaten mit 100 % Luftfeuchtigkeit bei 21 °C inkubiert. Dann wurden infizierte Blattstücke von 0,5 × 2 mm ausgeschnitten und 60 Minuten bei 20 °C in einer Lösung von frisch dest. 3,5 % Glutaraldehyd und 2 % Glucose in 0,08 M Cacodylatpuffer pH 7,1 vorfixiert. Nach dem Auswaschen in mehrmals gewechseltem Cacodylatpuffer 0,08 M pH 7,1 mit 4 % Sucrose wurde in 2 % Osmiumsäure mit 0,08 M Cacodylatpuffer und 4 % Sucrose über Nacht im Kühlschrank fixiert. Nach Auswaschen im gleichen

Puffer mit Saccharose wurde über eine Alkoholreihe und Propylenoxid in Epoxidharz nach SPURR (1969) eingebettet. Die mit dem Reichert Om U3 angefertigten Ultradünnschnitte wurden mit Uranylacetat und Bleicitrat nach REYDOLDS (1963) kontrastiert und im Zeiss EM 9 ausgewertet.

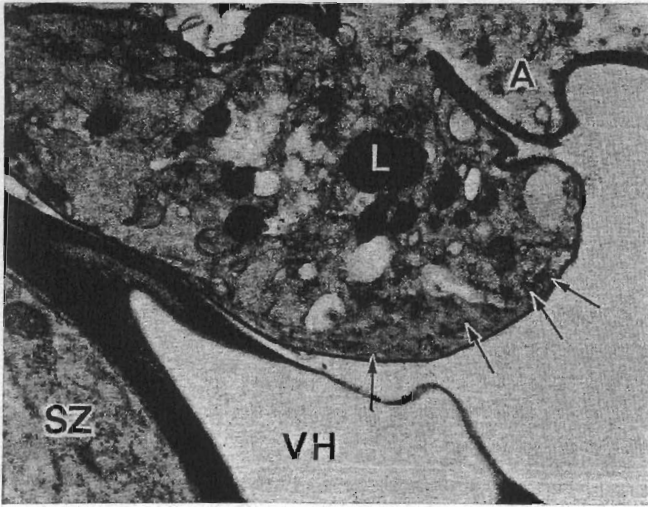


Abb. 1. Beginn der Appressorienbildung. Über dem Vorhof der Spaltöffnung sind elektronendichte Einlagerungen (Pfeile) in der Wand des Appressoriums zu erkennen (11 680 \times)

Zeichenerklärung: A — Appressorium; C — cutinisierte Vorhofleiste des Stoma; G — Glyoxysomen; H — Hyphe; Ha — Haustorium; IP — „infection peg“; HMZ — Haustoriummutterzelle; K — Kern; L — Lipidkörper; M — Mitochondrium; NZ — Nebenzelle; P — Plastid; S — Septum; SV — substomatäres Vesikel; SZ — Schließzelle; VH — Vorhof der Spaltöffnung.

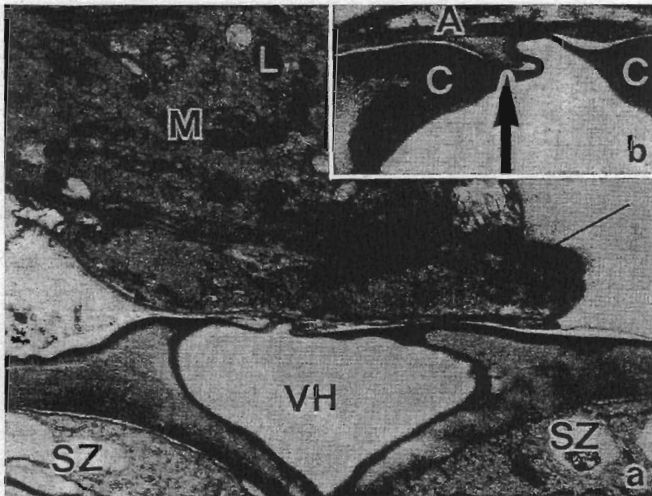


Abb. 2. a) Fertiges Appressorium mit Einlagerungen in der Wand (7920 \times). b) Haken des Appressoriums (Pfeil) in der Randleiste des Vorhofs der Spaltöffnung (20 000 \times)

Ergebnisse

1. Das Eindringen des Pilzes in die Pflanze

Das von der Keimhyph gebildete Appressorium fällt durch dichtes Plasma mit vielen Mitochondrien und Lipidkörpern auf (Abb. 1 und 2). In der schräg angeschnittenen Wand erkennt man ungleichmäßige, elektronendichte Einlagerungen (Abb. 1 und 2). Stellenweise ist die Wand des Appressoriums in die von der Cuticula gebildete äußere Randleiste des Stoma eingehakt (Abb. 2 b). Nach der Infektion kollabiert das leere Appressorium (Abb. 3).

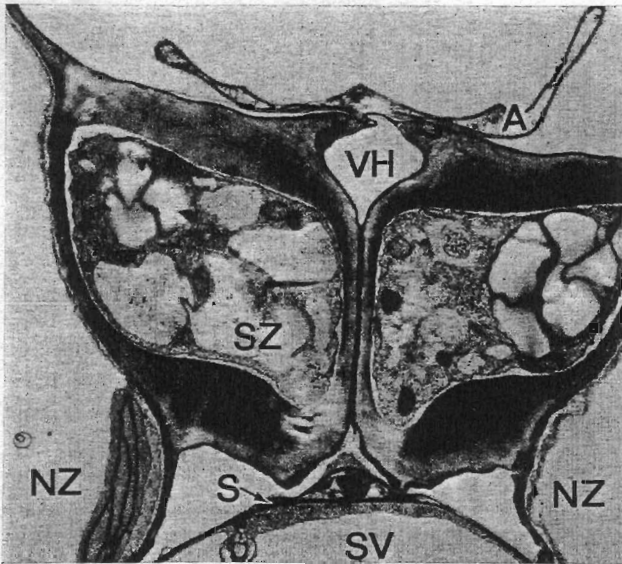


Abb. 3. Kollabiertes Appressorium auf der Spaltöffnung. Unter den Schließzellen liegt das durch ein Septum vom „infection peg“ abgeteilte substomatäre Vesikel (5040 \times)

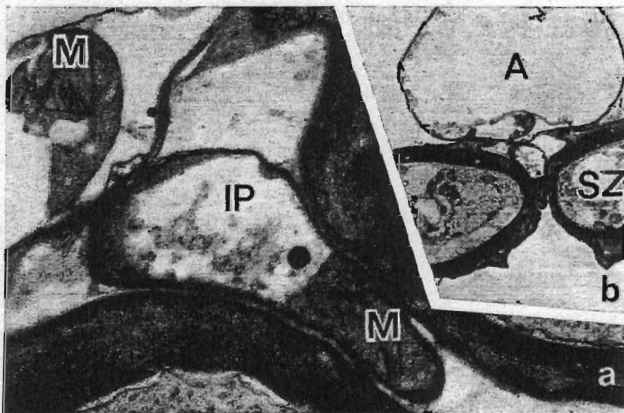


Abb. 4. a) „infection peg“ während des Infektionsvorganges, schräg getroffen (14 000 \times).
b) Übersichtsaufnahme (2480 \times)

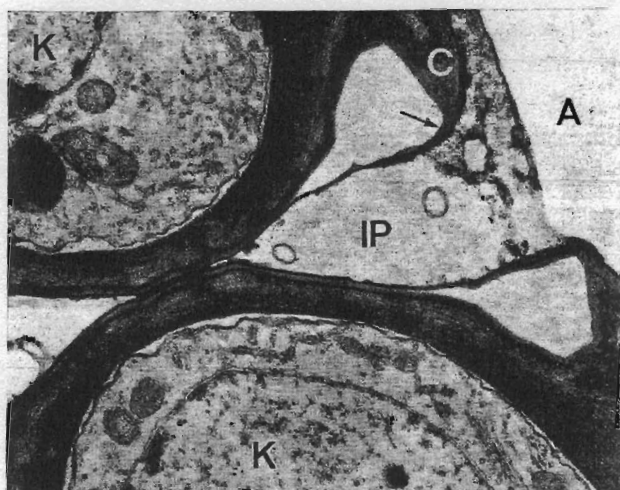


Abb. 5. Leerer „infection peg“ nach der Infektion.
Die Randleisten des Vorhofs sind nach innen gebogen (Pfeil) (14 400 \times)

Der Rost dringt mit dem „infection peg“ in die Spaltöffnung des Blattes ein (Abb. 4). Dabei biegt er die cutinisierten äußeren Randleisten der Spaltöffnung teilweise nach innen und füllt den Vorhof mehr oder weniger aus (Abb. 5 und 6). Durch den Vorschub des „infection peg“ werden die Schließzellen offensichtlich auseinandergedrückt. Der „infection peg“ ist etwa so weit wie ein Haustoriumshals. Ein Mitochondrium kann ihn fast ohne Verformung passieren (Abb. 4). Nach vollzogener Infektion werden die Spaltöffnungen, ebenso wie die nicht-infizierten Spaltöffnungen, stets geschlossen angetroffen.

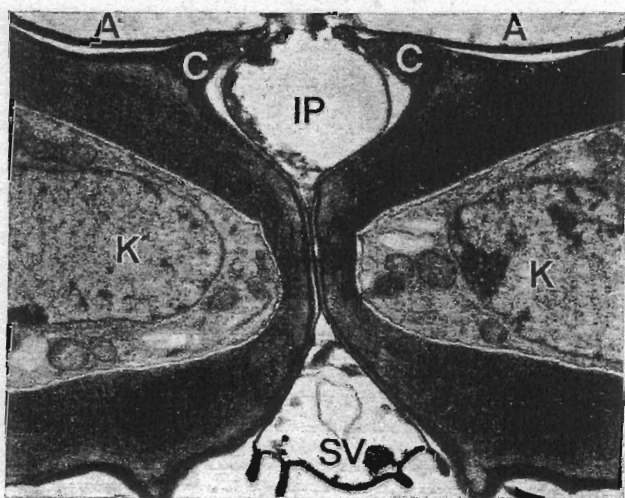


Abb. 6. Hier füllt der leere „infection peg“ den Vorhof fast ganz aus (8160 \times)

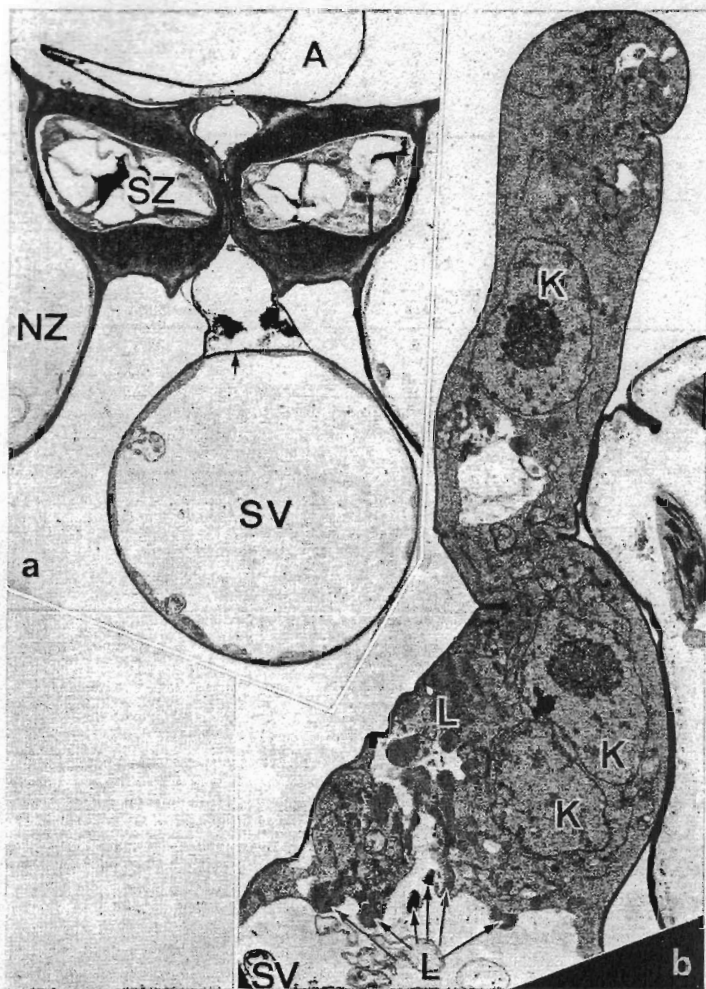


Abb. 7. a) Appressorium und substomatäres Vesikel nach der Infektion (3120 \times).
b) Die Infektionshyphe (5040 \times)

Im Hinterhof der Spaltöffnung weitet sich die Hypha wieder stark zu dem substomatären Vesikel (Abb. 3, 5, 6, 7), das durch ein Septum vom „infection peg“ abgetrennt wird. Das substomatäre Vesikel erfüllt einen großen Teil der Atemhöhle. Aus ihm entsteht die Infektionshypha (Abb. 7b). Alle beobachteten substomatären Vesikeln besitzen eine mehr oder weniger große Vakuole und ihr Plasma viele Lipidkörper und Glyoxysomen. Die nierenförmigen Glyoxysomen schmiegen sich meist an die Lipidkörper an. Um die Lipidkörper liegen oft etwa 300 bis 400 Å große, schollige Gebilde. Es handelt sich um β -Partikeln des Glycogens (Abb. 8), wie sie von TSCHEN und FUCHS (1970) nach Ausbildung der Sporenlager gefunden wurden.

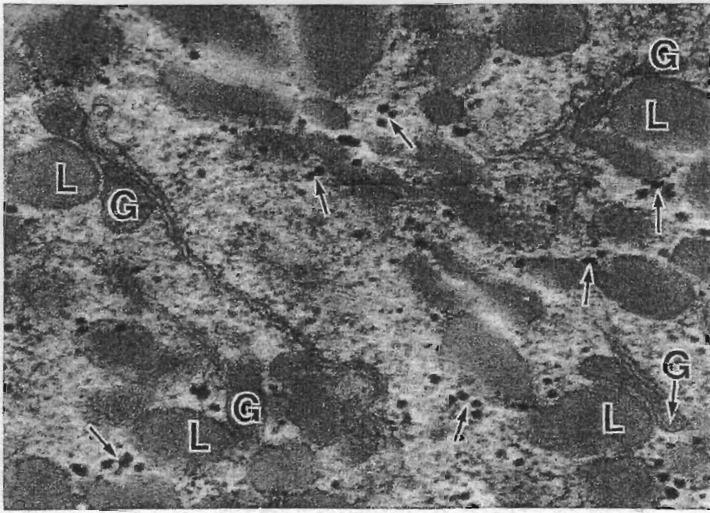


Abb. 8. Das Cytoplasma des substomatären Vesikel mit Lipidkörpern, Glyoxysomen und Glycogenschollen (Pfeile) (32 000 \times)

2. Bildung des ersten Haustoriums und damit einhergehende Veränderungen des Rostcytoplasmas

Die Haustoriumsmutterzelle ist durch ein Septum von der Infektionshyphę abgeteilt; sie besitzt mehrere Kerne (Abb. 9). Es war jedoch nicht möglich, an Serienschnitten die genaue Zahl der Zellkerne festzustellen. Abbildung 10 zeigt das Einwandern eines Kerns aus der Haustoriumsmutterzelle in das Haustorium. Dabei wird er stark verformt.

Die Feinstruktur des ersten Haustoriums stimmt im allgemeinen mit der Beschreibung der Haustorien vom dritten Tag nach Infektion (MENDGEN und

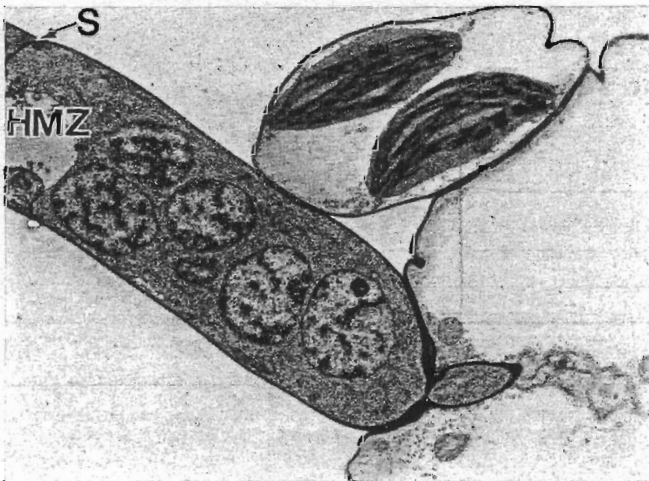


Abb. 9. Die Haustoriumsmutterzelle bei der Bildung des ersten Haustoriums (4640 \times)

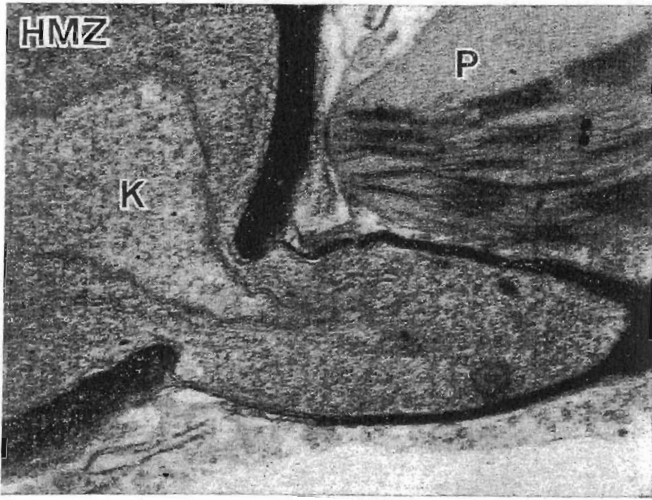


Abb. 10. Ein Kern wandert in das erste Haustorium des Bohnenrostes (23 200 \times)

FUCHS 1973) und älteren Stadien (HARDWICK, GREENWOOD und WOOD 1971) überein; wir konnten jedoch bei unseren Untersuchungen keinen Halsring beobachten (Abb. 11), obgleich in dieser Region, wie bei älteren Infektionsstadien, starke Peroxydaseaktivität nachzuweisen ist (MENDGEN 1973 a). Während besonders das substomatäre Vesikel und auch noch die Infektionshyphe durch viele Lipidkörper und Glyoxysomen geprägt sind (Abb. 8), ist es schwierig, in der

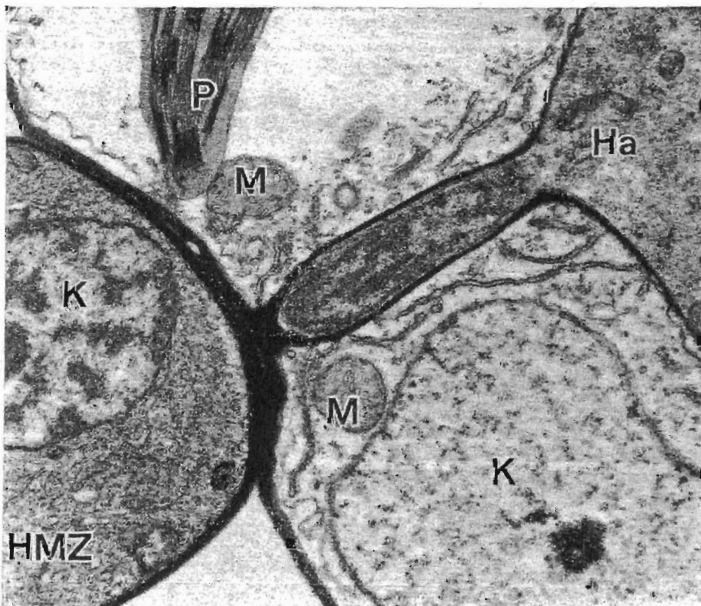


Abb. 11. Haustoriummutterzelle und Haustorium (9680 \times)

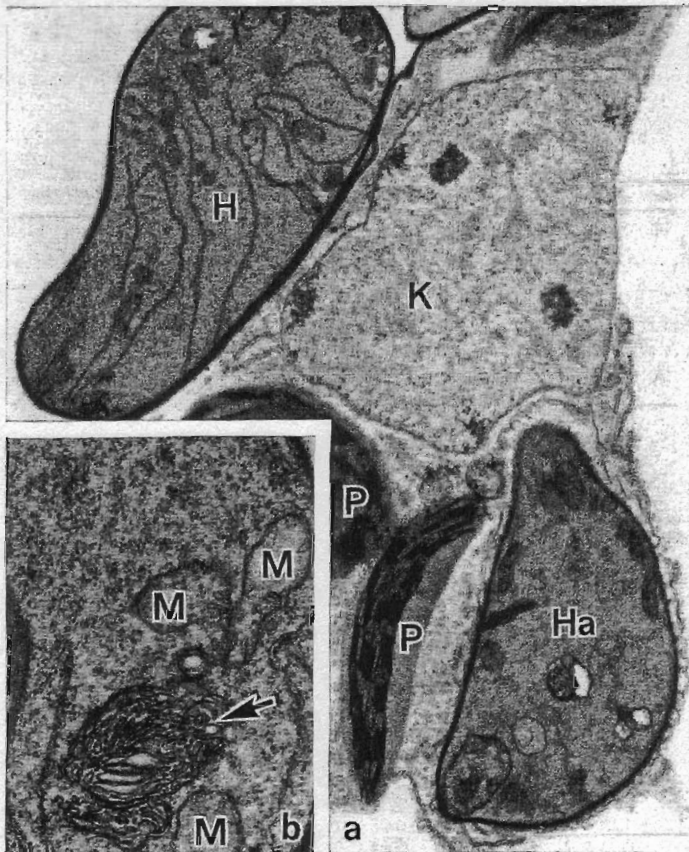


Abb. 12. Im Cytoplasma der Haustoriummutterzelle, des Haustoriums und der interzellulären Hyphe sind Lipidkörper und Glyoxysomen selten. a) interzelluläre Hyphe und Haustorium (8800 \times). b) Haustoriummutterzelle (Pfeil: Membrankörper) (24 000 \times)

Haustoriumsmutterzelle oder gar in der danach gebildeten interzellulären Hyphe diese Organellen zu finden (Abb. 12).

3. Reaktion der Wirtszelle auf das erste Haustorium

Alle von uns untersuchten Haustorien sind nicht reif. Die Kerne befinden sich noch in der Haustoriumsmutterzelle oder wandern gerade in das Haustorium. Zu diesem Zeitpunkt bemerkt man schon Reaktionen der Wirtszelle, wie sie in älteren Infektionsstadien beobachtet werden (HARDWICK, GREENWOOD und WOOD 1971, MENDGEN und FUCHS 1973). Der Kern liegt meistens in der Nähe des Haustoriums (Abb. 11, 12, 13). Die Zisternen des rauhen endoplasmatischen Retikulums verlaufen oft parallel zur Oberfläche des Haustoriums und dessen Hals (Abb. 12). In mehreren Fällen wird ein Kontakt zwischen dem endoplasmatischen Retikulum und der Kernhülle in der Umgebung des Haustoriums beobachtet (Abb. 13). Die Plastiden zeigen keine Veränderung gegenüber den nicht-



Abb. 13. Kontakt zwischen Kernhülle und rauhem endoplasmatischen Retikulum in der Umgebung (Pfeil) des Haustoriums (22 400 \times)

infizierten Zellen in der Umgebung der Infektionsstelle (Abb. 13). Dies stimmt mit Beobachtungen beim Erbsenrost überein (HEATH und HEATH 1971).

Diskussion

Wenn die Infektion durch geschlossene Spaltöffnungen erfolgen kann (vgl. BURRAGE 1970), stellt sich die Frage nach einem Widerlager für das Appressorium. Beim Bohnenrost scheint es sich auf der Spaltöffnung den nötigen Halt zu verschaffen, indem es sich an die Falten der Cuticula auf der Oberfläche schmiegt und sich so an der äußeren Randleiste der Spaltöffnung festhakt. Der anschließend gebildete „infection peg“ vermag dann die äußere Randleiste des Vorhofs nach innen zu biegen und die Schließzellen soweit auseinanderzudrücken, daß die Zellorganellen etwa wie beim Hals des Haustoriums diese Engstelle passieren können. Leere Appressorien fallen dann bald zusammen (ZIMMER 1965) und auch der leere „infection peg“ ist, wenn er kein Plasma enthält, stets eng zusammengedrückt. Auf diese Weise könnte ein Widerlager für mechanisches Eindringen geschaffen sein, ohne daß das Appressorium auf der Oberfläche festklebt, wie dies bei *Erysiphe graminis* (STANBRIDGE, GAY und WOOD 1971) und bei den Zoosporen von *Phytophthora palmivora* (SING und BARTNICKI-GARCIA 1972) beschrieben worden ist.

Mit der Ausbildung des ersten Haustoriums beginnt die biotrophe Phase der Rostpilze. Dies bedeutet eine tiefgreifende Veränderung in der Physiologie des Parasiten und läßt sich an den Zellorganellen des Bohnenrostes erkennen. Die Anzahl der Lipidtröpfchen nimmt ab, weil die in der Spore vorhandenen Reservefette (WILLIAMS und LEDDINGHAM 1964) verbraucht und nach Bildung des Haustoriums wohl auch nicht mehr benötigt werden. Die zum Abbau benötigten Enzymsysteme (z. B. β -Oxydation, Glyoxylatzyklus) wurden in keimenden Rostsporen teilweise schon nachgewiesen (FREAR und JOHNSON 1961); sie sind bei Pflanzen in den Glyoxysomen lokalisiert (TOLBERT 1971). Die Glyoxysomen liegen meist nierenförmig an den Lipidkörpern im Keimlingsplasma (VIGIL 1970). Es könnte sich also auch beim Bohnenrost bei den Gebilden, welche den Lipidkörpern anliegen, um Glyoxysomen handeln.

Die bei höheren Pflanzen beobachteten Glyoxysomen reagieren jedoch im DAB-Test (Katalasenachweis) positiv (VIGIL 1970, LONGO, DRAGONETTI und LONGO 1972). Dies trifft auf die Glyoxysomen des Bohnenrostes nicht zu (MENDGEN 1973 b).

Im Gegensatz zu den Glyoxysomen in den Infektionsstrukturen fanden COFFEY, PALEVITZ und ALLEN (1972) bei *Puccinia helianthi* und *Melampsora lini*, MENDGEN und FUCHS (1973) beim Bohnenrost microbodies mit kristallinen Einschlüssen, die im DAB-Test keine Reaktion zeigten. Die Bedeutung dieser Organellen ist völlig unklar, zumal noch unsicher ist, ob diese Zellorganellen nicht beliebig mit den jeweils benötigten Enzymen ausgestattet werden können (GERHARDT 1973).

Für die hilfreichen Diskussionen und die sorgfältige Durchsicht des Manuskripts danke ich Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. FUCHS, für die Gewährung der Arbeitsmöglichkeit am Elektronenmikroskop Herrn Prof. Dr. RÖBBELEN sehr herzlich.

Zusammenfassung

1. Das Appressorium des Bohnenrostes ist von dichtem Cytoplasma erfüllt. Die Wand des Appressoriums hakt sich in die Spalten und Falten der äußeren Randleiste des Vorhofs der Spaltöffnung ein.
2. Der vom Plasma erfüllte „infection peg“ drückt die geschlossenen Schließzellen auseinander. Nach Durchgang des Plasmas durch den „infection peg“ schließt sich die Spaltöffnung wieder und das Appressorium kollabiert.
3. Im substomatären Vesikel fallen zahlreiche Lipidkörper, Glyoxysomen und Glycogen (β -Partikeln) auf. In der Haustoriumsmutterzelle, im ersten Haustorium und in der danach entstehenden sekundären Hyphe fehlen Glyoxysomen und Glycogen; Lipidkörper werden selten.

Summary

Electronmicroscopy of the Bean Rust Infection Structures

The appressorium of the bean rust fungus is filled with dense cytoplasm. The wall of the appressorium partly contains dark granular deposits and the

appressorium appears to mold itself into the fissures and folds of the outer ledge of the stoma.

The infection peg pushes the guard cells apart. After the passage of the fungus cytoplasm through the infection peg, the stoma closes again and the appressorium collapses.

In the substomatal vesicle, glyoxysomes, lipid bodies and glycogen particles (β -particles) are numerous. But in the haustorial mother cell, the first haustorium and the secondary hyphae, lipid bodies and especially glyoxysomes are scarce. This indicates a change in number of these organelles at the beginning of the biotrophic phase, i. e. when the first haustorium develops.

Literaturverzeichnis

- ALLEN, R. F., 1923a: A cytological study of infection of Baart and Kanred wheats by *Puccinia graminis tritici*. J. agric. Res. 23, 131—152.
- , 1923b: Cytological studies of infection of Baart, Kanred and Mindum wheats by *Puccinia graminis tritici* forms III and XIX. J. agric. Res. 26, 571—604.
- BARY, M. A. DE, 1863: Recherches sur le développement de quelques champignons parasites. Ann. Sci. nat. 4e Ser. Bot. 20, 5—148.
- BURRAGE, W. S., 1970: Environmental factors influencing the infection of wheat by *Puccinia graminis*. Ann. appl. Biol. 66, 429—440.
- COFFEY, M. D., B. A. PALEVITZ, and P. J. ALLEN, 1972: The fine structure of two rust fungi, *Puccinia helianthi* and *Melampsora lini*. Canad. J. Bot. 50, 231—240.
- EVANS, I. B. P., 1907: The cereal rusts. I. The development of their Uredo mycelia. Ann. Bot. 21, 441—466.
- FREAR, D. S., and M. A. JOHNSON, 1961: Enzymes of the glyoxylate cycle in germinating uredospores of *Melampsora lini*. Biochim. biophys. Acta 47, 419—421.
- GERHARDT, B., 1973: Untersuchungen zur Funktionsänderung der Microbodies in den Keimblättern von *Helianthus annuus* L. Planta (Berlin) 110, 15—28.
- HARDWICK, N. V., A. D. GREENWOOD, and R. K. S. WOOD, 1971: The fine structure of the haustorium of *Uromyces appendiculatus* in *Phaseolus vulgaris*. Canad. J. Bot. 49, 383—390.
- HEATH, M. C., 1971: Haustorial sheath formation in cowpea leaves immune to rust infection. Phytopathology 61, 383—388.
- , and I. B. HEATH, 1971: Ultrastructure of an immune and susceptible reaction of cowpea leaves to rust infection. Physiol. Plant Path. 1, 277—287.
- LITTLEFIELD, L. J., and C. E. BRACKER, 1972: Ultrastructural specialisation of the host-pathogen interface in rust-infected Flax. Protoplasma 74, 271—305.
- LEATH, K. T., and J. B. ROWELL, 1966: Histological study of the resistance of *Zea mays* to *Puccinia graminis*. Phytopathology 56, 1305—1309.
- LONGO, G. P., C. DRAGONETTI, and G. P. LONGO, 1972: Cytochemical localisation of catalase in glyoxysomes isolated from maize scutella. Plant Physiol. 50, 453.
- MENDGEN, K., 1973a: Peroxidase activity of the haustorial neck in resistant and susceptible varieties of bean to the bean rust. 2nd Intern. Congr. Plant Path. (Minneapolis).
- , 1973b: Microbodies (glyoxysomes) in infection structures of *Uromyces phaseoli*. Protoplasma (im Druck).
- , und W. H. FUCHS, 1973: Elektronenmikroskopische Darstellung peroxydatischer Aktivitäten bei *Phaseolus vulgaris* nach Infektion mit *Uromyces phaseoli typica*. Arch. Mikrobiol. 88, 181—192.
- REYNOLDS, E. S., 1963: The use of lead citrate at high pH as electron opaque stain in electron microscopy. J. biophys. biochem. Cytol. 17, 208—212.

- SING, V. O., and S. BARTNICKI-GARCIA, 1972: Adhesion of zoospores of *Phytophthora palmivora* to solid surfaces. *Phytopathology* 62, 790 (Abstr.).
- SPURR, A. R., 1969: A low viscosity Epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J. Ultrastruct. Res.* 26, 31—43.
- STANBRIDGE, R., J. L. GAY, and R. K. S. WOOD, 1971: Gross and fine structural changes in *Erysiphe graminis* and barley before and during infection. In: T. F. PREECE and C. H. DICKINSON (Eds.), *Ecology of leaf surface microorganisms*. London.
- TSCHEN, J., and W. H. FUCHS, 1970: Histochemischer Nachweis der Polysaccharid-Synthese in Bohnenprimärblättern nach Infektion mit *Uromyces phaseoli*. *Phytopath. Z.* 67, 78—86.
- TOLBERT, N. E., 1971: Microbodies — peroxisomes and glyoxysomes. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 22, 45—74.
- VIGIL, E. L., 1970: Cytochemical and developmental changes in microbodies (glyoxysomes) and related organelles of Castor bean endosperm. *J. Cell Biol.* 46, 435—454.
- WARD, M. H., 1903: II. On the histology of *Uredo dispersa*, Erikss., and the "Mycoplasm" hypothesis. *Phil. Transact. Roy. Soc. London S. B* 196, 29—46.
- WILLIAMS, P. G., and G. A. LEDINGHAM, 1964: Fine structures of wheat stem rust uredospores. *Canad. J. Bot.* 42, 1503—1508.
- ZIMMER, D. E., 1965: Rust infection and histological response of susceptible and resistant safflower. *Phytopathology* 55, 296—301.

Anschrift des Verfassers: Institut für Pflanzenpathologie und Pflanzenschutz der Universität, D-34 Göttingen-Weende, Grisebachstraße 6.