

Elektronenmikroskopische Darstellung peroxydatischer Aktivitäten bei *Phaseolus vulgaris* nach Infektion mit *Uromyces phaseoli typica*

K. Mendgen und W. H. Fuchs

Institut für Pflanzenpathologie und Pflanzenschutz der Universität Göttingen

Eingegangen am 10. August 1972

Electronmicroscopic Demonstration of Peroxidase Activities in *Phaseolus vulgaris* after Infection with *Uromyces phaseoli typica*

Summary. Peroxidase activity in *Phaseolus vulgaris* (cultivar Favorit), infected with *Uromyces phaseoli typica*, was studied with the help of an electronmicroscope. The plant material was prefixed three days after inoculation and 3,3-diaminobenzidine was used as a substrate to detect the enzyme activity.

The mitochondrial membranes showed an enhanced enzyme activity (due to a cytochrome oxidase or possibly due to a cytochrome peroxidase) in the infected cell. There was no change in the structure and catalase activity of peroxisomes of the host. No catalase activity was detected in the fungus.

A layer with evident peroxidase activity is seen outside the cell wall. This layer is sometimes thickened especially when it is in touch with intercellular hyphae.

The penetration site of the haustorium has been intensively studied. Activity was observed in the neck region (from the penetration site of the haustorium to the neckband) in the zone between the host plasmalemma and the plasmalemma of the fungus. Some activity was also seen on the cisternae of the endoplasmic reticulum surrounding the neck. In a few preparations, activity was also found between sheath and wall of the haustorium.

Zusammenfassung. Bei der Wirt-Parasit-Kombination *Phaseolus vulgaris* (cv. Favorit) und *Uromyces phaseoli typica* wird die Aktivität peroxydatischer Enzyme am dritten Tag nach Infektion elektronenmikroskopisch dargestellt. Die Aktivität in den Mitochondrien (möglicherweise eine Cytochromoxydase oder Cytochromperoxydase) ist in der infizierten Zelle erhöht. Die Peroxisomen (sie enthalten eine Katalase) bleiben in der infizierten Zelle unverändert. Im Pilz wird keine Katalaseaktivität gefunden.

Die Schicht mit peroxydatischer Aktivität auf der Außenseite der Zellwand (Zellwandperoxydase) ist an der Berührungsstelle Hyphe — Wirtswand oft verdickt. An der Eintrittsstelle des Haustoriums in die Zelle wird Aktivität auf der Wand des Haustoriumhalses und auf den Cisternen des benachbarten ribosomenbesetzten endoplasmatischen Reticulums beobachtet. Manchmal findet man auch eine Schicht mit peroxydatischer Aktivität zwischen Scheide und Wand des Haustoriums.

Bei verschiedenen Wirt-Parasit-Kombinationen wird nach Infektion ein Anstieg der Peroxydaseaktivität beobachtet (Wood, 1967; Kosuge, 1969). Nach Auftrennung in Isoenzyme zeigen jedoch nicht

alle Banden der Peroxydase eine verstärkte Aktivität (Hislop u. Stahmann, 1971). Daly (1972) hält es für möglich, daß ein bestimmtes Peroxydaseisoenzym in Zusammenhang mit der thermolabilen Schwarzrotresistenz der Weizen Marquis *Sr 6* und Marquis *Sr 11* steht.

Die Differenzierung der Peroxydasen ist aber außer durch elektrophoretische Auftrennung auch durch Lokalisation von Aktivitäten an verschiedenen Orten der Zellen möglich. Mit Hilfe von Diaminobenzidin (DAB) als Substrat (Graham u. Karnovsky, 1966) können in verschiedenen Objekten Aktivitäten auf der äußeren Zellwand (z. B. Vigil, 1970), auf den Mitochondrienmembranen (Novikoff u. Goldfischer, 1969; Lumsden *et al.*, 1969; Gerhardt u. Berger, 1971), in Peroxisomen (Frederick u. Newcomb, 1971; u.v.a.), auf Ribosomen (Novikoff, 1970; Czaniński u. Catesson, 1970), in Dictyosomen und auf dem Plasmalemma (Czaniński u. Catesson, 1970) dargestellt werden. Eine solche Reaktion kann sowohl durch Peroxydasen (E.C. 1.11.1.7) als auch unter Umständen durch Katalasen (E.C. 1.11.1.6) und Cytochromoxydasen (E.C. 1.9.3.1) ausgelöst werden. Der Einsatz von Inhibitoren kann im Einzelfall Anhaltspunkt über die Natur der Aktivität geben.

Tschen u. Fuchs (unveröffentlicht) hatten lichtmikroskopisch eine starke Erhöhung peroxydatischer Enzyme im Pustelbereich von *Uromyces phaseoli* auf Blättern von *Phaseolus vulgaris* gefunden. Eine Untersuchung, welche Orte in der Zelle bei Wirt und Parasit peroxydatische Aktivität besitzen bzw. nach Infektion erhalten, erscheint daher besonders aufschlußreich.

Material und Methoden

10 Tage nach der Aussaat wurden die Primärblätter der Buschbohne (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Favorit) mit einer Uredosporensuspension besprüht (Tschen, 1966). 3 Tage nach Infektion (wenn nicht anders angegeben) wurden Blattstücke mit schwach chlorotischen Stellen ausgestochen und 60 (90) min bei 20°C in einer Lösung von 3% Formol (bereitet nach Karnovsky, 1965), 2% Glutaraldehyd (reinst, Serva) und 0,07 M Phosphatpuffer pH 7,3 vorfixiert. Zu Beginn der Fixierung wurde kurz evakuiert, dann wiederholt in 0,07 M Phosphatpuffer pH 7,3 je 30 min und schließlich 1 h in dem Puffer des jeweiligen Inkubationsmediums gewaschen. In folgenden Medien wurde inkubiert (nach Novikoff, 1970, modifiziert):

a) *pH 6 Medium*. 9,9 ml 0,05 M Acetatpuffer pH 5 und 20 mg Diaminobenzidintetrachlorid (Merck, p.A.) wurden gemischt, 0,1 ml 0,1% H₂O₂ zugegeben und vor Zugabe der Blattstücke auf pH 6 eingestellt.

b) *pH 9 Medium*. 9,8 ml 0,05 M Aminomethanpropandiol und 20 mg Diaminobenzidintetrachlorid wurden gemischt, 0,2 ml 1% H₂O₂ zugegeben und vor Zugabe der Blattstücke auf pH 9 eingestellt.

In Parallelversuchen wurde der letzten Waschflüssigkeit vor Inkubation und den Inkubationsmedien 0,02 M Aminotriazol (AT) (Fluka, purum) zur Hemmung der Katalase oder 0,01 M KCN zur Hemmung von Peroxydase, Katalase und Cytochromoxydase zugesetzt.

Nach 1 Std Inkubation bei 37°C im Dunkeln wurde in mehrmals gewechseltem 0,07 M Phosphatpuffer pH 7,3 gewaschen, mit 2% Osmiumsäure in dem gleichen

Puffer nachfixiert, über eine Alkoholreihe (in einigen Versuchen war der 70% Alkohol mit Uranylacetat gesättigt) entwässert und in Epon (Spurr, 1969) eingebettet. Von den Proben wurden zuerst 2 μ -Schnitte zur Beobachtung unter dem Lichtmikroskop hergestellt und dann der Rand der von Hyphen durchwachsenen Gewebszone auf dem Block markiert. Hier wurden Ultradünnschnitte (Reichert, Ultramikrotom OmU3) angefertigt und diese ohne weitere Kontrastierung im Elektronenmikroskop (Zeiss EM 9 A) ausgewertet.

Ergebnisse

Diaminobenzidin (DAB) hinterläßt nach enzymatischer Oxydation oder Peroxydation auf dem entsprechenden Ort der Zelle eine braune Färbung, die im Elektronenmikroskop als dichter elektronenundurchlässiger Niederschlag leicht erkennbar ist. Die Inkubationsmedien wurden nach einem Vorschlag von Novikoff (1970) so eingestellt, daß im pH 6-Medium eine optimale Aktivität der Mitochondrien und im pH 9-Medium der Peroxisomen zu erwarten war. Das Ergebnis dieser Untersuchungen bei Wirt und Parasit zeigt Tab. 1.

Tabelle 1

Übersicht über die bei verschiedenen Versuchsbedingungen erhaltenen Reaktionen

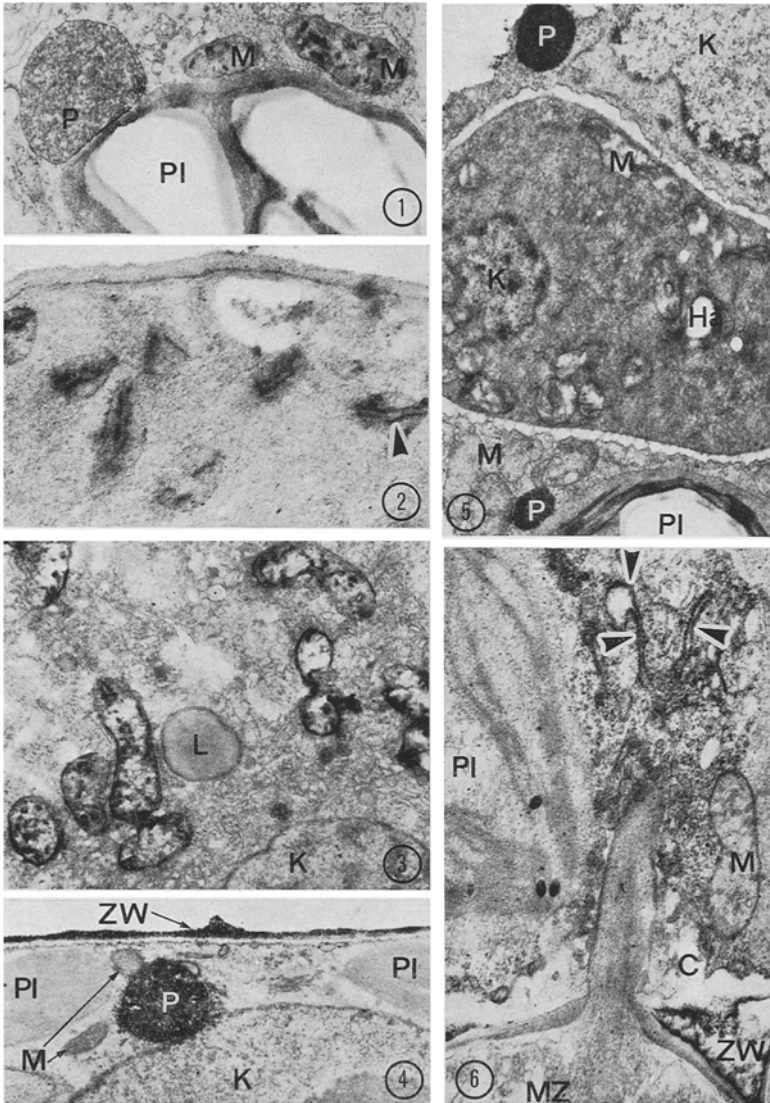
Orte mit Aktivität	Aktivität in Abhängigkeit von den Versuchsbedingungen							
	pH 6 60' Fix.	pH 6 90' Fix.	pH 6 + KCN	pH 6 + AT	pH 9 60' Fix.	pH 9 90' Fix.	pH 9 + KCN	pH 9 + AT
Mitochondrien (Wirt)	++	-	-	+	-	-	-	-
Mitochondrien (Pilz)	++	-	-	+	(+)	-	-	(+)
Peroxisomen (Wirt)	(+)	-	-	-	++	++	+	-
Zellwand (Wirt)	++	++	(+)	+	++	++	(+)	+
ER am Haustorium (Wirt)	+	+	-	+	++	+	-	+

Zeichenerklärung: ++ = starke Reaktion; + = deutliche Reaktion; (+) = zweifelhafte Reaktion; - = keine Reaktion.

1. Beobachtungen an Mitochondrien

Nach Inkubation der Gewebestücke bei pH 6 weisen die Membranen der Mitochondrien in den Zellen von Wirt und Parasit einen deutlichen Niederschlag auf. Meist scheinen die Tubuli bzw. Christae stärker kontrastiert als die Außenmembranen der Mitochondrien (Abb. 1 und 2). Nur in den Uredosporenmutterzellen (Bez. nach Gäumann, 1964) zeigen alle Mitochondrienmembranen einen gleichmäßig kräftigen Niederschlag (Abb. 3).

In von Haustorien besetzten Zellen und in den Zellen des Leitbündelgewebes ist der Niederschlag auf den Mitochondrienmembranen kräftiger als in den Parenchymzellen des nichtinfizierten Gewebeteiles; dies läßt sich auch lichtmikroskopisch erkennen. Wird länger als 60 min vorfixiert, fällt die Reaktion aus. 0,01 M KCN hemmt die Reaktion völlig, 0,02 M Aminotriazol nur wenig.



- Abb.1. Aktivität auf den Mitochondrientubuli in einer infizierten Wirtszelle (pH 6-Medium). 16500 ×
- Abb.2. Aktivität auf den Mitochondrienchristae in der intercellulären Hyphe (pH 6-Medium). 36000 ×
- Abb.3. Aktivität auf den Mitochondrienmembranen der Uredosporenmutterzelle am 6. Tag nach Infektion (pH 6-Medium) 31000 ×
- Abb.4. Aktivität auf der Zellwand (Zellwandperoxydase) und im Peroxisom (Katalase) in einer nicht infizierten Zelle (pH 9-Medium). 11600 ×

2. Beobachtungen an Peroxisomen

Die Peroxisomen in den Parenchymzellen der Bohne besitzen eine einfache Membran, eine fein granuläre Matrix und keine Einschlußkörper. Nach Inkubation bei pH 9 zeigt die Matrix einen gleichmäßig dichten Niederschlag (Abb. 4).

In infizierten Zellen findet man die Peroxisomen auch in der Nähe des Haustoriums (Abb. 5). Ihre Struktur scheint nicht verändert. Weder in Keimschläuchen (unveröffentlichte Untersuchungen) noch in Hyphen oder Haustorien des Parasiten werden ähnliche Organellen mit einem Niederschlag gefunden.

3. Beobachtungen im Cytoplasma

Nach Inkubation in beiden Medien wird bei der lichtmikroskopischen Untersuchung in den Zellen der Leitbündel, der Epidermis und ganz besonders in den infizierten Zellen ein brauner Niederschlag im Cytoplasma beobachtet. Im Elektronenmikroskop fallen in den infizierten Zellen öfters die ribosomenbesetzten, flachen Zisternen des ER besonders in der Umgebung des Halses des Haustoriums durch starken Kontrast auf (Abb. 6). Diese Reaktion wird durch KCN, aber kaum durch Aminotriazol, gehemmt.

4. Beobachtungen auf den Zellwänden

Nach Inkubation bei pH 6 und 9 zeigen viele Zellen des Schwamm- und Palisadenparenchyms, besonders in der Nähe der Leitbündel, auf der Außenseite der Zellwand und im Bereich der Mittellamelle einen dichten Niederschlag (Abb. 4). Dieser fehlt nach Zusatz von 0,01 M KCN zum Inkubationsmedium, aber nicht nach Zusatz von 0,02 M Aminotriazol.

Die intercellulären Hyphen des Parasiten liegen oft direkt an dieser Schicht mit peroxydatischer Aktivität. Im Bereich der Kontaktstelle ist der Belag mit Aktivität meist nur teilweise oder überhaupt nicht verdickt (Abb. 7). Die Hyphen haben bis auf Ausnahmen keinen Niederschlag auf der Außenseite der Zellwand.

In die Wand der Haustoriumsmutterzelle scheint in der Umgebung der Penetrationsstelle eine Schicht mit schwacher Aktivität eingelagert

Abb. 5. Infizierte Wirtszelle mit Aktivität in den Peroxisomen (pH 9-Medium).
8500 ×

Abb. 6. Aktivität auf dem ribosomalen ER (Pfeile) in der Nähe des Halses des Haustoriums (pH 9-Medium). 19000 ×

Zeichenerklärung: *C* Kragen; *DL* dense layer; *Ha* Haustorium; *Hh* Hals des Haustoriums; *Hr* Halsring; *H* Hyphe; *K* Kern; *L* Lipidkörper; *M* Mitochondrium; *MZ* Haustoriumsmutterzelle; *Pl* Plastid; *P* Peroxisom; *S* Scheide; *W* Wand des Haustoriums; *ZW* Zellwandperoxydaseaktivität

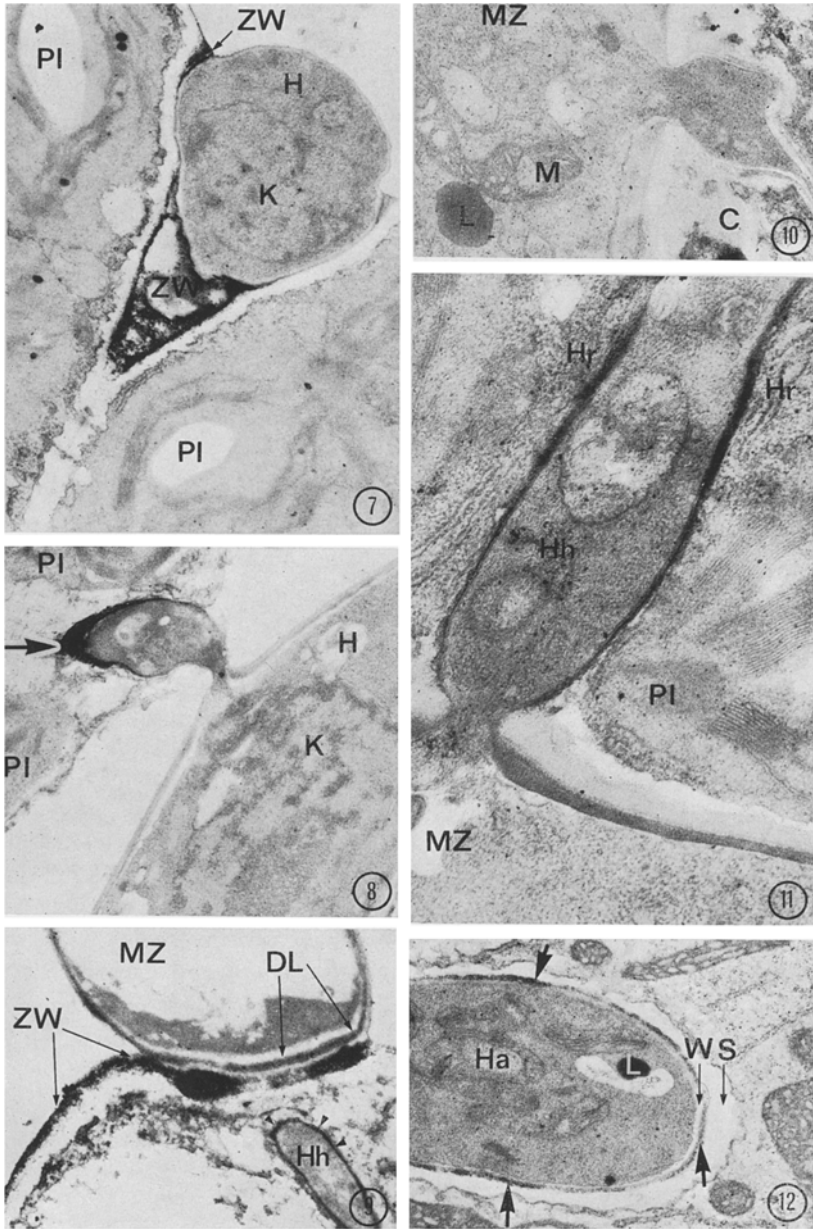


Abb. 7-12

zu sein (Abb. 9). Sie wird aber nicht regelmäßig gefunden. Diese Schicht entspricht vielleicht der "dense layer" bei *Melampsora lini* (Littlefield u. Bracker, 1972).

Regelmäßig wird im Bereich des Halses des Haustoriums eine kräftige, ebenfalls durch KCN hemmbare Peroxydaseaktivität (vgl. Abb. 8 und 10) festgestellt. Der Niederschlag beginnt dicht hinter der Penetrationsstelle, reicht bis zum Halsring des Haustoriums (Abb. 11) und bedeckt die schmale Zone zwischen dem Plasmalemma des Wirtes und dem Plasmalemma des Parasiten. Beim Halsring sind Pilzplasmalemma, Bohnenplasmalemma und die Zwischenzone von dem dichten Niederschlag überdeckt.

Der Kragen (Bez. nach Bracker, 1968) des Haustoriums bleibt ohne Niederschlag.

Im allgemeinen ist die Aktivität auf die Halsregion des Haustoriums beschränkt. In wenigen Fällen wird jedoch auch ein Niederschlag zwischen Scheide (Bez. nach Bracker, 1968; entspricht der „Encapsulation“ nach Ehrlich u. Ehrlich, 1963) und Wand des Haustoriums beobachtet (Abb. 12).

Diskussion

DAB wird als Substrat zur elektronenmikroskopischen Darstellung der Aktivität von Peroxydase, Katalase und Cytochromoxydase verwendet (vgl. Hirai, 1971). Durch Inkubation im Dunkeln (Hirai, 1971) kann man eine Photooxydation (Nir u. Seligman, 1970), durch Parallelversuche mit Hemmstoffen nichtenzymatische Oxydationen (z. B. durch Melanin, Novikoff *et al.*, 1971 b) ausschließen.

Peroxisomen wurden bisher in vielen Geweben gefunden (vgl. Tolbert, 1971; Frederick u. Newcomb, 1971). Sie scheinen bei Pflanzen unter anderem einen Teil der zur Photorespiration benötigten Enzyme zu ent-

Abb. 7. Der Niederschlag zwischen Wirtswand und intercellulärer Hyphe ist nicht gleichmäßig ausgebildet (pH 9-Medium). 10000 ×

Abb. 8. Aktivität (Pfeil) im Bereich des Halses eines jungen Haustoriums (pH 6-Medium). 11 000 ×

Abb. 9. Man erkennt einen Niederschlag auf der Wand des Halses (*Hh*), auf der Wirtswand (*ZW*) und nur schwache Aktivität (*DL*) in der Wand der Haustoriummutterzelle in der Umgebung der Penetrationsstelle (pH 9-Medium). 10 200 ×

Abb. 10. Fehlende Aktivität in der Halsregion des Haustoriums und auf den Mitochondrienmembranen nach Zusatz von 0,01 M KCN zum Inkubationsmedium (pH 6-Medium). 17 500 ×

Abb. 11. Halsregion des Haustoriums mit Niederschlag von der Penetrationsstelle bis einschließlich zum Halsring (*Hr*) (pH 9-Medium). 11 000 ×

Abb. 12. Aktivität (Pfeile) zwischen der Wand (*W*) des Haustoriums (*Ha*) und der Scheide (*S*) (pH 9-Medium). 12 000 ×

halten. Die Niederschläge in den Peroxisomen werden durch die peroxydatische Aktivität der Katalase (Novikoff u. Goldfischer, 1969), einem „Leitenzym“ dieser Organellen, hervorgerufen. Aminotriazol (AT) hemmt die Katalase spezifisch (Margoliash *et al.*, 1960).

In den infizierten Zellen des Wirtes werden von uns keine Veränderungen der Peroxisomen bemerkt. Bei *Carthamus tinctorius* L. beobachtete Zimmer (1970), daß bei dem resistenten Cultivar Nebraska 1-1-5 „crystal-containing bodies“ nach Eindringen des Haustoriums von *Puccinia carthami* verschwinden. In mosaikkranken Dahlien nimmt die Zahl der Organellen mit kristalloiden Einschlußkörpern dagegen eher zu (Petzold, 1967). Es ist allerdings unklar, ob es sich bei diesen Arbeiten um Peroxisomen im Sinne von Frederick u. Newcomb (1971) oder Lysosomen im Sinne von Matile (1969) handelt, da eine cytochemische Untersuchung fehlt.

Im Parasiten finden wir mit der DAB-Reaktion keine Peroxisomen. Jüngste Untersuchungen (Coffey *et al.*, 1972) an *Melampsora lini* und *Puccinia helianthi* bestätigen diese Beobachtungen. Pitt (1969) und Reiss (1971) hatten versucht, lichtoptisch die Peroxisomen in Pilzen mit DAB nachzuweisen. Da die Mitochondrien jedoch ebenfalls mit DAB reagieren können und der Katalasehemmstoff Aminotriazol auch die Aktivität der Mitochondrien beeinflussen kann (Gerhardt u. Berger, 1971), sind lichtmikroskopische Untersuchungen nicht unbedingt eindeutig.

Andererseits finden wir im intercellulären Mycel in der Nähe des Porus bei *Uromyces phaseoli*, wie auch jüngst bei *Melampsora lini* und *Puccinia carthami* (Coffey *et al.*, 1972), Organellen mit einer einfachen Membran und einem kristallinen Einschlußkörper. Auch bei *Polytomella caeca*, *Chlorogonium elongatum* (Gerhardt u. Berger, 1971) und *Euglena gracilis* (Graves *et al.*, 1971) findet man beim Wachstum auf Acetat Organellen, deren Inhalt DAB nicht zu oxidieren vermag. Graves *et al.* (1971) führen dies auf die Ernährung mit Acetat oder Alkohol zurück.

Die dichte Ablagerung auf den *Mitochondrien*membranen nach Inkubation im pH 6-Medium ist wahrscheinlich das Ergebnis einer Bindung von oxidiertem DAB an Cytochrom c (Hirai, 1971). Die Oxydation des DAB ist der Cytochromoxydase (Seligman *et al.*, 1968; Nir u. Seligman, 1970) oder vielleicht einer Cytochromperoxydase zuzuschreiben (Gerhardt u. Berger, 1971). Eine Cytochromperoxydase wurde allerdings bisher nur aus Hefemitochondrien gereinigt dargestellt (Yonetani u. Ohnishi, 1966). Zudem weisen die Hefemitochondrien nach Inkubation in einem pH 6-Medium keine Aktivität auf (Todd u. Vigil, 1972).

Im Gegensatz zu den Beobachtungen von Olah *et al.* (1971) bei *Puccinia graminis* (7 Tage nach der Infektion) zeigten in unseren Versuchen die Mitochondrien in den infizierten Wirtszellen keine veränderte

Gestalt. Der besonders kräftig ausgeprägte Niederschlag in den infizierten Wirtszellen deutet jedoch auf einen erhöhten Stoffwechsel.

Der Niederschlag auf der *Außenseite* der Zellwände ist das Ergebnis einer Aktivität von Zellwandperoxydase, da diese Reaktion nach Weglassen von H_2O_2 und nach KCN-Zusatz unterbleibt (eigene Untersuchung; Vigil, 1970; Czaninski u. Catesson, 1970; De Jong, 1967). Die entsprechende Schicht der Zellwand besteht zum großen Teil aus Protein (Colvin u. Leppard, 1971) und besitzt möglicherweise auch Phosphataseaktivitäten (Poux, 1970).

Im infizierten Gewebe erscheint die Schicht mit peroxydatischer Aktivität an der Berührungsstelle mit der Hyphe öfters verdickt. Dies paßt sehr gut zu den neuesten Beobachtungen an *Melampsora lini* auf *Linum* (Littlefield u. Bracker, 1972) und *Uromyces phaseoli* var. *vignae* auf der als Wirtspflanze ungeeigneten *Phaseolus vulgaris* L. (cv. Pinto) (Heath, 1972). Die Autoren beobachteten an dieser Stelle der Zellwand eine Anhäufung von elektronendichtem Material.

Die auffälligsten Veränderungen finden wir in der *Halsregion* des *Haustoriums*. Hier scheint sich eine besondere Phase im Verhältnis Wirt-Parasit abzuzeichnen.

Littlefield u. Bracker (1972) zeigen nach Periodatbehandlung eine kontinuierliche Wandschicht, die von der „dense layer“ in der Haustoriumsmutterzelle bis zum Halsring reicht. Der Halsring selbst wird durch Periodat aufgelöst.

Wir finden auf der möglicherweise entsprechenden Wandschicht — sie wird beim Bohnenrost allerdings an der Penetrationsstelle unterbrochen (s. Abb.1 bei Hardwick *et al.*, 1971; Heath u. Heath, 1971) — eine peroxydatische Aktivität. Das dem Hals des Haustoriums benachbarte, ribosomenbesetzte endoplasmatische Reticulum zeigt ebenfalls eine peroxydatische Reaktion. Ob die Ribosomen in der Umgebung der Penetrationstelle peroxydatische Enzyme oder Enzymuntereinheiten produzieren, wäre sicherlich von Bedeutung. Auf Grund verschiedener Untersuchungen, die jedoch meist an tierischen Objekten ausgeführt wurden (Wood u. Legg, 1970; Novikoff, 1970; Novikoff *et al.*, 1971 a; Poux, 1970; Penon *et al.*, 1970), könnte der Niederschlag auf dem ribosomalen ER in dieser Weise erklärt werden.

Im Gegensatz zu den eher quantitativen Veränderungen enzymatischer Aktivitäten auf der Außenseite der Zellwand und in den Mitochondrien könnte es sich bei den Aktivitäten in der Region des Halses des Haustoriums um qualitative Veränderungen handeln. Dies trifft besonders für den Niederschlag auf dem ribosomalen ER zu.

Die Aktivität in der Zone zwischen Wirtsplasmalemma und Pilzplasmalemma in der Halsregion könnte jedoch auch mit Zellwandperoxydase des Wirtes identisch sein. Die Zone mit Aktivität könnte

Wirt und Parasit trennen. Diese Hypothese wird durch Beobachtungen an den Haustorien unterstützt, wo manchmal eine Aktivität zwischen Scheide und Wand des Haustoriums gefunden wird. Coffey *et al.* (1972) diskutieren, Manocha u. Lee (1972) liefern bei *Choanephora cucurbitarum* Beweise für die Annahme, daß die Scheide vom Wirt gebildet wird.

Wenn man unsere histochemischen Untersuchungen mit den bisherigen quantitativen Untersuchungen peroxydatischer Aktivitäten (z. B. Seevers *et al.*, 1971; Sako u. Stahman, 1972) vergleicht, so hat man den Eindruck, daß diese Befunde mit Messungen an aufgetrennten Extrakten gut in Einklang gebracht werden können. Nach beiden Verfahren wird deutlich, daß größtenteils vorhandene Enzymaktivitäten nach Infektion (z. B. Aktivitäten in Mitochondrien und auf den Zellwänden) erhöht werden.

Herrn Prof. Dr. Röbbelen danken wir sehr herzlich für die Gewährung der Arbeitsmöglichkeit am Elektronenmikroskop.

Literatur

- Bracker, C. E.: Ultrastructure of fungi. *Ann. Rev. Phytopath.* **5**, 343—374 (1968).
- Coffey, M. D., Palevitz, B. A., Allen, P. J.: The fine structure of two rust fungi, *Puccinia helianthi* and *Melampsora lini*. *Canad. J. Bot.* **50**, 231—240 (1972).
- Colvin, J. R., Leppard, G. G.: The non-uniform distribution of proteins in plant cell walls. *J. Microsc.* **11**, 285—298 (1971).
- Czaninski, Y., Catesson, A. M.: Activités peroxidasiques d'origines divers dans les cellules d'*Acer pseudoplatanus* (tissus conducteurs et cellules en culture). *J. Microsc.* **9**, 1089—1102 (1970).
- Daly, J. M.: The use of near-isogenic lines in biochemical studies of resistance of wheat stem rust. *Phytopathology* **62**, 392—400 (1972).
- DeJong, D.: An investigation of the role of plant peroxidase in cell wall development by the histochemical method. *J. Histochem. Cytochem.* **15**, 335—346 (1967).
- Ehrlich, H. G., Ehrlich, M. A.: Electronmicroscopy of the host-parasite relationship in stem rust of wheat. *Amer. J. Bot.* **50**, 123—130 (1963).
- Frederick, S. E., Newcomb, E. H.: Ultrastructure and distribution of microbodies in leaves of grasses with and without CO₂-photorespiration. *Planta (Berl.)* **96**, 152—174 (1971).
- Gäumann, E.: Die Pilze. Basel-Stuttgart: Birkhäuser 1964.
- Gerhardt, B., Berger, Ch.: Microbodies und Diaminobenzidin-Reaktionen in den Acetatflagellaten *Polytomella caeca* und *Chlorogonium elongatum*. *Planta (Berl.)* **100**, 155—166 (1971).
- Graham, R. C., Karnovsky, M. J.: The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney: ultrastructural cytochemistry by a new technique. *J. Histochem. Cytochem.* **14**, 291—302 (1966).
- Graves, L. B., Hanzley, L., Trelease, R. N.: The occurrence and fine structural characterisation of microbodies in *Euglena gracilis*. *Protoplasma (Wien)* **72**, 141—152 (1971).
- Hardwick, N. V., Greenwood, A. D., Wood, R. K. S.: The fine structure of the haustorium of *Uromyces appendiculatus* in *Phaseolus vulgaris*. *Canad. J. Bot.* **49**, 383—390 (1971).
- Heath, M. C.: Ultrastructure of host and nonhost reactions to cowpea rust. *Phytopathology* **62**, 27—38 (1972).

- Heath, M. C., Heath, I. B.: Ultrastructure of an immune and susceptible reaction of cowpea leaves to rust infection. *Physiol. Plant. Path.* **1**, 277—287 (1971).
- Hirai, K.: Comparison between 3,3'-Diaminobenzidine and autooxidized 3,3'-Diaminobenzidine in the cytochemical demonstration of oxidative enzymes. *J. Histochem. Cytochem.* **19**, 434—442 (1971).
- Hislop, C. E., Stahman, M. A.: Peroxidase and ethylene production by barley leaves infected with *Erysiphe graminis f. sp. hordei*. *Physiol. Plant. Path.* **1**, 297—312 (1971).
- Karnovsky, M. J.: A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.* **27**, 137 A (1965).
- Kosuge, T.: The role of phenolics in host response to infection. *Ann. Rev. Phytopath.* **7**, 195—222 (1969).
- Littlefield, L. J., Bracker, C. E.: Ultrastructural specialisation at the host-pathogen interface in rust infected flax. *Protoplasma (Wien)* **74**, 271—305 (1972).
- Lumsden, R. D., Oaks, J. A., Mills, R. R.: Mitochondrial oxidation of diaminobenzidine and its relationship to the cytochemical localisation of tapeworm peroxidase. *J. Parasit. J.* **55**, 1119—1133 (1969).
- Manocha, M. S., Lee, K. Y.: Host-parasite relations in mycoparasite. II. Incorporation of tritiated N-acetyl-glucosamine into *Choanephora cucurbitarum* infected with *Piptocephalis virginiana*. *Canad. J. Bot.* **50**, 35—37 (1972).
- Margoliash, E., Novogrodsky, A., Schejter, A.: Irreversible reactions of 3-amino-1:2:3-triazole and related inhibitors with the protein of catalase. *Biochem. J.* **74**, 339—348 (1960).
- Matile, Ph.: Enzymologie pflanzlicher Zellkompartimente. *Ber. dtsh. bot. Ges.* **82**, 397—405 (1969).
- Nir, I., Seligman, A. M.: Photooxidation of diaminobenzidine (DAB) by chloroplast lamellae. *J. Cell Biol.* **46**, 617—620 (1970).
- Novikoff, A. B.: Visualization of cell organelles by diaminobenzidine reactions. 7th Int. Congr. Micr. Electr., Grenoble. P. Favard, éd., Soc. Franc. Micr. Electr., Paris, vol I, pp. 565—566 (1970).
- Novikoff, A. B., Beard, M. E., Albala, A., Sheid, B., Quintana, N., Biempica, L.: Localisation of endogenous peroxidases in animal tissues. *J. Microsc.* **12**, 381—404 (1971a).
- Novikoff, A. B., Biempica, L., Beard, M., Dominitz, R.: Visualization by diaminobenzidine of norepinephrine cells, premelanosomes and melanosomes. *J. Microsc.* **12**, 297—300 (1971b).
- Novikoff, A. B., Goldfischer, S.: Visualisation of peroxisomes (microbodies) and mitochondria with diaminobenzidine. *J. Histochem. Cytochem.* **17**, 675—680 (1969).
- Olah, G. M., Pinon, J., Janitor, A.: Modifications ultrastructurales provoquées par *Puccinia graminis f. sp. tritici* chez le blé. *Mycopathologia (Den Haag)* **44**, 325—346 (1971).
- Penon, P., Cecchini, J. P., Miassod, R., Ricard, J., Teissere, M., Pinna, M. H.: Peroxidase associated with lentil root ribosomes. *Phytochemistry* **9**, 73—86 (1970).
- Petzold, H.: Kristalloide Einschlüsse im Zytoplasma pflanzlicher Zellen. *Protoplasma (Wien)* **64**, 120—133 (1967).
- Pitt, D.: Cytochemical evidence for the existence of peroxisomes in *Botrytis cineria*. *J. Histochem. Cytochem.* **17**, 613—616 (1969).
- Poux, N.: Localisation d'activités enzymatiques dans les cellules du méristème racinaire de *Cucumis sativus* L. II. Activité phosphatasique acide. *J. Microsc.* **9**, 407—434 (1970).

- Reiss, J.: Cytochemische Darstellung von Peroxisomen in Pilzzellen. *Protoplasma* (Wien) **72**, 43—48 (1971).
- Sako, N., Stahmann, M. A.: Multiple molecular forms of enzymes in barley leaves infected with *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*. *Physiol. Plant. Path.* **2**, 217—226 (1972).
- SeEVERS, P. M., DALY, J. M., CATEDRAL, F. F.: The role of peroxidase isoenzymes in resistance to wheat stem rust disease. *Plant Physiol.* **48**, 353—360 (1971).
- Seligman, A. M., Karnovsky, M. J., Wasserkrug, H. L., Hanker, J. S.: Nondroplet ultrastructural demonstration of cytochromoxidase activity with a polymerising osmiophilic reagent, diaminobenzidine (DAB). *J. Cell Biol.* **38**, 1—14 (1968).
- Spurr, A. R.: A low viscosity Epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J. Ultrastruct. Res.* **26**, 31—43 (1969).
- Todd, M. M., Vigil, E. L.: Cytochemical localisation of peroxidase activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Histochem. Cytochem.* **20**, 344—349 (1972).
- Tolbert, N. E.: Microbodies-peroxisomes and glyoxysomes. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **22**, 45—74 (1971).
- Tschen, J.: Die Verteilung einiger durch *Uromyces phaseoli* (Pers) Wint. induzierter Veränderungen des Stoffwechsels im Primärblatt von *Phaseolus vulgaris* L. Diss., Landw. Fak. Univ. Göttingen 1966.
- Tschen, J., Fuchs, W. H.: Enzymaktivität in Handschnitten von Bohnenblättern nach Infektion mit *Uromyces phaseoli typica*. Unveröffentlicht (1969).
- Vigil, E. L.: Cytochemical and developmental changes in microbodies (glyoxysomes) and related organelles of Castor bean endosperm. *J. Cell Biol.* **46**, 435—454 (1970).
- Wood, R. K. S.: *Physiological plant pathology*. Oxford: Blackwell Scientific Publications 1967.
- Wood, R. L., Legg, P. G.: Peroxidase activity in rat microbodies after aminotriazole inhibition. *J. Cell Biol.* **45**, 576—585 (1970).
- Yonetani, T., Ohnishi, T.: Cytochrome c peroxidase, a mitochondrial enzyme of yeast. *J. biol. Chem.* **241**, 2983—2984 (1966).
- Zimmer, D. E.: Fine structure of *Puccinia carthami* and the ultrastructural nature of exclusionary seedling-rust resistance of safflower. *Phytopathology* **60**, 1157—1163 (1970).

Dr. Kurt W. Mendgen
Prof. Dr. Dr. h.c. W. H. Fuchs
Institut für Pflanzenpathologie
und Pflanzenschutz
der Universität
D-3400 Göttingen, Grisebachstr. 6
Bundesrepublik Deutschland