

**DIE ULTRASTRUKTURELE HISTOPATOLOGIE VAN  
EXSEROHILUM PEDICELLATUM (HENRY) LEONARD & SUGGS  
TYDENS DIE INFEKSIE VAN MIELIEWORTELS**

**EDWARD MALHERBE CILLIERS**

**B.Sc., Hons.B.Sc., H.O.D.(N)**

**Verhandeling voorgelê vir gedeeltelike nakoming van die vereistes vir die graad Magister Scientiae in die Departement Bodem- en Plantwetenskappe aan die Potchefstroomse Universiteit vir Christelike Hoër Onderwys.**

**Leier: Prof. W.J. Jooste**

**POTCHEFSTROOM**

**1992**

## VOORWOORD

Graag wil ek my dank teenoor die volgende persone en instansies uitspreek:

My opregte dank en waardering aan my eggenote, Ansie, vir haar ondersteuning, begrip en geduld wat sy gedurende die verloop van die studie teenoor my openbaar het.

My Vader en Moeder vir al hul ondersteuning en opofferings. Daarsonder sou veral die ondersoek nie moontlik gewees het nie.

My skoonouers vir hul onderskraging en bystand. Dit word opreg waardeer.

Mnr. en mev. K. Harvey vir hul meer as net morele ondersteuning.

My opregte dank aan prof. W.J. Jooste wat as studieleier opgetree het. Sy waardevolle leiding, advies, inspirasie en hulp het net die grootste respek en agting by my afgedwing.

Dr. L.R. Tiedt en dr. V. Hamilton-Adwell vir hul hulp en advies met die elektronmikroskopie.

Die personeel van die Dept. Bodem- en Plantwetenskappe, veral dr. H. Kruger, vir hul advies en leiding gedurende die tydperk.

Mev. R. Booyen vir die taalversorging van die verhandeling.

Mnr. J. Grobler vir die teken van die wortelinokulering-toestel.

Mev. O. Mouton vir die tik van dele van die verhandeling.

Mnr. C. Opperman asook die Tegnieese Afdeling van Hoërskool Vryburg vir die beskikbaarstelling van rekenaars wat die afhandeling van die verhandeling bespoedig het.

Dank aan die WNNR vir die finansiële bystand wat grotendeels die ondersoek moontlik gemaak het.

Alle eer aan my Skepper.

## INHOUDSOPGAWE

HOOFSTUK EEN	INLEIDING	1
HOOFSTUK TWEE	LITERATUUROORSIG	3
2.1	Die patogeen	3
2.2	Ultrastrukturele histopatologie van die patogeen- gasheerverhouding	6
2.2.1	Pre-infeksiefaktore	6
2.2.2	Penetrasie van die gasheerselwande deur die patogeen	7
2.2.2.1	Die vorming van penetrasiestrukture	8
2.2.2.2	Ensiematiese bevordering van penetrasie van gasheerselwande	9
2.2.3	Kolonisering van die gasheer deur die patogeen	10
2.3	Ultrastrukturele effek van die patogeen in gasheerselle	11
2.3.1	Selwande	12
2.3.2	Selmembrane	13
2.3.3	Mitochondrions	13
2.3.4	Kern en sitoplasma	13
2.4	Toksiene	14
2.4.1	Oorsigtelike beskouing	14
2.4.2	Ultrastrukturele effek van fungustoksiene	15
2.4.2.1	Selwande	15
2.4.2.2	Membraansisteme	15
2.4.2.3	Mitochondrions	16
2.4.2.4	Selkerne, ribosome en endoplasmiese retikulum	17
2.5	<u>"Helminthosporium"</u> toksiene	17

## INHOUDSOPGAWE (Vervolg)

HOOFSTUK DRIE	MATERIAAL EN METODES	19
3.1	Isolering en vermeerdering van <u>Exserohilum pedicellatum</u>	19
3.2	Metode om steriele mielie-saailinge te kweek	20
3.3	Vorbereiding van 'n steriele soliede groeimedium	20
3.4	Vloeibare voedingsmedium vir die mieliesailinge	21
3.5	Kweking en inokulasie van proefplante	21
3.6	Wortel-inokuleringsstoestel (WI-toestel)	23
3.7	Versameling en voorbereiding van plantmateriaal vir fiksering	25
3.8	Vorbereiding vir skandeerelektronmikroskopie	26
3.8.1	Fiksering van die materiaal	26
3.8.2	Verwydering van intrasellulêre sitoplasma	27
3.8.3	Dehidrering van materiaal	27
3.8.4	Afwerking van materiaal met behulp van polietileenglikol vir SEM	27
3.8.5	Kritiese punt droging	28
3.9	Vorbereiding van materiaal vir transmissie-elektron- en ligmikroskopie	29
3.9.1	Fiksering van plantmateriaal	29
3.9.2	Dehidrering van materiaal	29
3.9.3	Lokalisering van lokusse, mikrotomering en kleuring van materiaal	29
3.10	Mikrotomering en montering van materiaal in hars vir ligmikroskopie	30
3.11	Verheldering en kleuring van wortels vir ligmikroskopie	31
3.12	Sellulase-histochemie van geïnfekteerde wortelweefsel met transmissie-elektronmikroskopie	31
3.13	Blootstelling van gasheerweefsel aan sellulase en die skandeerelektronmikroskopie daarvan	32
3.14	Fluoresensie-mikroskopie	33

## INHOUDSOPGAWE (Vervolg)

3.15 Onderzoek na die moontlike produksie van 'n fungus- metaboliet deur die patogeen	33
3.15.1 Produksie en ekstrahering van 'n metaboliet afkomstig van die patogeen	34
3.15.2 Blootstelling van materiaal aan die fungusmetaboliet	35
3.15.2.1 Bepaling van die invloed van die fungusmetaboliet op ontkieming en saailinggroei	35
3.15.2.2 Onderzoek na die effek van die fungusmetaboliet op die ultrastruktuur van wortelselle	35

## HOOFTUK VIER RESULTATE EN BESPREKING

4.1 Uitwendige kenmerke en simptome van geïnfekteerde mielie- plante	37
4.1.1 Mieliesaaillinge in vermikuliet-groeimedium	37
4.1.2 Mieliesaaillinge in die WI-toestel	39
4.2 Voorpenetrasie-aspekte van die ultrastrukturele patogeen- gasheer-verhouding	40
4.2.1 Ontkieming	40
4.2.2 Appressoriumvorming	42
4.3 Penetrasiefase	43
4.4 Koloniseringsfase	48
4.4.1 Verloop van kolonisering	48
4.4.2 Die ultrastrukturele effek van die patogeen op die gasheerselle tydens kolonisering	52
4.5 Reprodusiefase	56
4.6 Invloed van die fungusmetaboliet op groei van saailinge en die ultrastruktuur van wortelweefsel	59
4.7 Die effek van selwand-afbrekende ensieme op geïnfekteerde wortel- en mesokotielweefsel	62

INHOUDSOPGAWE (Vervolg)

HOOFSTUK	VYF	SAMEVATTENDE BESPREKING	66
BYLAES			75
ABSTRACT			80
LITERATUURLYS			82

## HOOFSTUK EEN

### INLEIDING

Exserohilum pedicellatum (Henry) Leonard & Suggs (= Bipolaris pedicellata (Henry) Shoem.) is 'n fungus wat deel is van die wortelvrot-kompleks van mielies ( Miller, 1963; Du Toit, 1966; Rao et al., 1978). Volgens Shepherd et al. (1967) word E. pedicellatum, indien dit aanwesig is, met wortelvrot van jong plante geassosieer waar dit die primêre en sekondêre wortels aantast.

Daar is 'n aantal studies wat gehandel het oor die effek van die fungus op mielieplante. Oor patogenisiteit en die ekonomiese belangrikheid is daar verskille in die beskikbare literatuur. Miller (1964) meen dat die fungus hoogs patogeen teenoor mieliewortels is. Tveit (1956) en Rao et al. (1978) meld dat E. pedicellatum effens patogeen teenoor mielie- en hawerwortels onderskeidelik is. Volgens Shepherd et al. (1967) is dit egter onwaarskynlik dat die patoogeen van ekonomiese belang is. Hulle meen dat dit nie 'n sterk patoogeen is omdat dit geen nadelige effek op die groei van bopgrondse plantdele het nie. Du Toit (1966) en Jonker (1967) het in studies oor wortelvrot bevind dat die fungus 'n beduidende invloed op die mielieplante het ten spyte daarvan dat dit geen plantsterftes veroorsaak nie. Hulle meen dat die wortelverrotting sekondêre gevolge soos vogstremming tydens droogte en omval van plante gedurende winderige toestande kan hê. Jonker (1967) meen ook dat dit die belangrikste wortelvrot-patoogeen van mielies is.

Benewens mielies is graansorghum, hawer, koring, gars en verskeie grassoorte as alternatiewe gashere van E. pedicellatum aangemeld maar dit het nie enige van die gashere ernstig benadeel nie

(Tveit, 1956; Shepherd et al., 1967).

Mikroskopiese ondersoek oor die histopatologie van die fungus in mieliewortels is beperk tot ligmikroskopiese studies (Sonderhousen & Boothroyd, 1965; Du Toit, 1966). Daar is geen inligting oor die ultrastrukturele histopatologiese effek van die patogeen nie.

Die volgende is as doelwitte vir die studie gestel:

1. Onderzoek na die wyse van penetrasie en die bepaling van infeksieelokusse in die verskillende wortelstreke.
2. Onderzoek na die koloniserings van wortelweefsels om meganismes in die verband te bepaal.
3. Onderzoek na die reprodusiefase van die patogeen om te bepaal waar en hoe lank na infeksie sporulering plaasvind.
4. Onderzoek na die ultrastrukturele histopatologie om te bepaal wat die invloed van die patogeen op weefsel- en selultrastruktuur is.
5. Onderzoek na die moontlikheid of daar 'n toksiese metaboliet by patogeenese betrokke is.

HOOFSTUK TWEE  
LITERATUUROORSIG

2.1 Die patogeen

Die patogeen is in 1924 beskryf as Helminthosporium pedicellatum Henry en beskryf Nelson (1965) die teleomorf as Trichometasphaeria pedicellatum Nelson. Die fungus word later in Bipolaris pedicellata (Henry) Shoem. geplaas na aanleiding van die bipolêre ontkieming van die konidiums (Shoemaker, 1959). Daarna word dit in 1966 deur Subramanian en Jain geplaas in Drechslera pedicellatum (Henry) Subram. & Jain met die voorgestelde kombinasie van Drechslera Ito en Bipolaris Shoem. in een genus naamlik Drechslera Ito (Leonard & Suggs, 1974). Die fungus word later op grond van die duidelik uitstaande hilum oorgeplaas na Exserohilum pedicellatum (Henry) Leonard & Suggs met Setosphaeria pedicellata Leonard & Suggs as die teleomorf (Leonard & Suggs, 1974). Die benaming word so aanvaar deur Sivanesan (1987) in sy oorsig van die "Helminthosporium"-verwante fungusse.

Shepherd et al. (1962) het die patogenisiteit van E. pedicellatum teenoor mieliewortels aangedui en maak melding van die donkerbruin letsels op die mieliewortels wat deur nekrose van die wortelweefsel veroorsaak is by die aanwesigheid van die patogeen.

E. pedicellatum se dikwandige konidiums het die vermoë om lang tydperke hul kiemkragtigheid te behou. Dit het steeds ontkiem na dit vir twee jaar in droë omstandighede by 4°C gestoor is. (Mathre, 1969). Die ontkieming van die konidiums van E. pedicellatum word deur die aanwesigheid van mieliewortels gestimuleer (Du Toit, 1969) en Miller (1964) meld dat mielieworteleksudate die groei van die fungus stimuleer. Die konidiums van E. pedicellatum kan ook op wateragar te ontkiem (Mathre, 1969).

Die ontkieming van die konidiums van E. pedicellatum vind optimaal by 39°C plaas (Mathre, 1969). Die fungus beskik oor die vermoë om te ontkiem by temperature tussen 27°C en 42°C (Shepherd et al., 1967).

E. pedicellatum het optimaal by 27°C vegetatief gegroei (Shepherd et al., 1967) terwyl Mathre (1969) bevind het dat 30°C die optimum temperatuur vir kiembuisverlenging en groei van die fungus is. Shepherd et al. (1967) meld dat die fungus 'n voorkeur vir hoër grondtemperature het, aangesien die invloed van die fungus op mieliewortels die grootste by 24°C was en dat die skade van bykans soortgelyke omvang by 30°C was. Die mate van weefselindringing was egter aansienlik minder by 18°C. Volgens Jonker (1967) is die pH voorkeur van die fungus 5,5.

E. pedicellatum kan epidermisselle van mieliewortels direk penetreer of dit kan tussen twee aangrensende epidermisselle indring (Sonderhousen & Boothroyd, 1965; Du Toit, 1966). 'n Opvallende verwyding aan die infeksiehife gaan penetrasie vooraf met 'n minder opvallende verwyding van die hife in die sellumen na penetrasie. Tydens penetrasie van die selwand vernou die infeksiehife. Die aard van die penetrasie is dieselfde ongeag of 'n epidermale of korteksselwand gepenetreer word. (Sonderhousen & Boothroyd, 1965). Geen duidelike bewys is gevind dat die patogeen van die wonde, soos veroorsaak deur nuwe sywortels, gebruik maak nie, alhoewel dit vermoed word (Du Toit, 1966). Die patogeen beskik oor die vermoë om pektinase te produseer (Jonker & Potgieter, 1970) wat moontlik 'n rol in letselontwikkeling kan speel.

Volgens Shepherd et al. (1967) is die letsels aanvanklik effens

bruin en waterig. Met die verloop van tyd vergroot en verleng dit om donkerbruin ingesonke letsels te vorm wat oor die algemeen rondom die wortel strek. Dit lei tot gedeeltelike of totale vernietiging van die kortekswaefsel in die gekoloniseerde gedeelte. Na ligmikroskopiese ondersoek is vasgestel dat aanvanklik slegs kortekswaefsel deur die patogeen aangetas word. Du Toit (1966) vermeld die aanwesigheid van 'n "gomagtige stof" in die intersellulêre ruimtes van die korteks, asook die gedisorganiseerde voorkoms van die waefsel in gevorderde stadiums van kolonisering.

Volgens Du Toit (1966) en Shepherd et al. (1967) is van die wortelwaefsel onder die endodermis na die vernietiging van die kortekswaefsel steeds funksioneel soos blyk uit die ontstaan van sywortels uit die perisikel van aangetaste dele en die vervoer van water en voedingstowwe na die bogrondse dele, wat tydens gunstige toestande geen of min stremming toon.

Hifes word slegs in die gevorderde stadiums van infeksie onder die endodermis in die vaatwaefsel aangetref (Sonderhousen & Boothroyd, 1965). Na verloop van 'n ongespesifiseerde tyd het die letsels sover as die vaatwaefsel gestrek (Shepherd et al., 1967).

Sporulering vind drie weke na infeksie in die kortekswaefsel plaas (Sonderhousen & Boothroyd, 1965.) Du Toit (1966) meld dat chlamidospore in die kortekswaefsel vorm nadat gevorderde kolonisering van die kortekswaefsel plaasgevind het.

Shepherd et al. (1967) het bevind dat daar by mielieplante wat kunsmatig met *E. pedicellatum* geïnkuleer is, geen stremming of vogspanning voorgekom het nie ten spyte van die verkleuring van bykans alle wortels en die degenerasie van die wortels se kor-

teksweefsel. Dit kan aan die vorming van nuwe wortels toegeskryf word. Die outeurs het tot die gevolgtrekking gekom dat die patogeen nie werklik van ekonomiese waarde is nie, aangesien hulle nie 'n betekenisvolle invloed van die patogeen op die groei van gasheerplant kon waarneem nie.

Miller (1964) het egter bevind dat die patogeen hoogs patogenies teenoor mieliewortels is. Rao et al. (1978) het bevind dat die fungus redelik virulent as wortelpatogeen by mielies is. Du Toit (1966) verwys na die gesonde voorkoms van geïnfekteerde mielies onder gunstige vogtoestande asook hul vermoë om koppe te produseer, maar meld dat die vermoë van die aangetaste wortels om die plant te anker, nie voldoende is nie.

Die fungus benut verskeie graan- en grassoorte as moontlike alternatiewe gasheer wat daartoe bydra dat die fungus in staat is om te oorleef in die afwesigheid van mielies en ook aanwesig is waar mielies nie teenwoordig is nie. (Tveit, 1956 ; Shepherd et al., 1967.)

## 2.2 Ultrastrukturele histopatologie van die patogeen-gasheerverhouding

### 2.2.1 Pre-infeksiefaktore

Die herkenning van en die oriëntering op 'n bepaalde gasheeroppervlak na aanleiding van oppervlakstimuli is 'n voorvereiste alvorens vashegting en penetrasie by 'n bepaalde lokaliteit deur die patogeen sal plaasvind (Wynn & Staples, 1981). Indringing kan bepaal word deur die aard van die gasheeroppervlak, optimale omgewingstoestande, die aan- of afwesigheid van stimulerende of inhiberende stowwe afkomstig van die gasheerweefsel en die aanwesigheid van antagonistiese mikroorganismes op die gasheeroppervlak. Laasgenoemde twee faktore geld veral vir wortelsiektes.

(Schroth & Hildebrand, 1964.)

Worteluitskeidings is belangrik vir die stimulering van kiemkragtige funguspropagules se ontkieming (Curl, 1982). Die verbindings wat as ontkiemingstimulus dien, moet ook die groei van die patogeen onderhou tot suksesvolle infeksie plaasgevind het (Bowen & Rovira, 1976). Die uitskeidings het 'n chemotropismiese effek op patogene deurdat dit die rigting van hifegroei asook appressoriumvorming effektief beïnvloed (Wynn & Staples, 1981).

Die belangrikste streke van plantwortels wat verantwoordelik is vir die uitskeiding van bepaalde verbindings, is die gedeelte net agter die wortelpunt, die wortelhaarstreek en die lokaliteite waar die sywortels ontstaan (Rovira, 1969). Mikroörganismes toon 'n voorkeur om al langs die kontaksones tussen wortelepidermisselle te groei as gevolg van die verhoogde uitskeiding van sekere stowwe by die betrokke dele van die worteloppervlak (Bowen & Rovira, 1976). Stresfaktore waaraan die plant onderwerp word, het 'n toename in worteluitskeidings tot gevolg wat lei tot die beïnvloeding van die patogeen se vermoë om, in die beperkende omstandighede vir die plant, infeksie te veroorsaak (Schroth & Hildebrand, 1964; Curl, 1982). Beperkende groeitoestande kan ook lei tot die predisponering van die gasheerplant sodat die natuurlike weerstand van die gasheer verswak word (Schoeneweiss, 1975 ; Blaker & MacDonald, 1981).

#### 2.2.2 Penetrasie van die gasheerselwande deur die patogeen

Die infeksie van plante is 'n aktiewe proses waardeur die fungus self die toegang tot die gasheer bewerkstellig (Goodman et al., 1967) en dit ontwikkel daarna interne miselium en ander strukture afhangende van die beperkings van die infeksie-eenheid (Buwalda et al., 1982). Die indringing in die gasheerweefsel is die mees

kritiese stadium in die daarstelling van 'n suksesvolle gasheer-patogeen-verhouding aangesien die stadium grootliks aan biotiese en abiotiese faktore onderhewig is (Garrett, 1979).

#### 2.2.2.1 Die vorming van penetrasiestrukture

Alvorens enige indringing van selwande deur die patogeen kan plaasvind, moet die penetrasiehife op die een of ander wyse aan die selwand heg. Dit vind plaas met 'n "slymagtige stof". (Wynn & Staples, 1981.) Bishop en Cooper (1983) het aangetoon dat tussen en oor die penetrasiestrukture van Fusarium oxysporum Schlecht. f. sp. pisi (van Hall) Syd. & Hans. ras 2, en die wortelselwande van ertjies 'n amorfe elektrondigte laag aanwesig is wat vir die vashegting van die struktuur verantwoordelik is.

Die primêre kenmerke van penetrasie behels die vorming van 'n appressorium of soortgelyke gespesialiseerde strukture aan die hifepunt waar dit in kontak met die gasheerselwand is, die vernouing van die penetrasiehife as dit deur die selwand groei en die terugkeer na normale dimensies van die hife na dit deur die selwand ontwikkel het (Aist, 1976; Harvey, 1977; Murray, 1982). Gelokaliseerde selwandafbraak vind rondom die penetrasiehife plaas. 'n Septum word soms in die hife gevorm waar dit deur die gasheerselwand strek. (Bishop & Cooper, 1983.) Penetrasie vereis egter nie altyd morfologies gespesialiseerde strukture nie soos blyk uit die indringing wat direk deur die kiembuis van Sclerotinia sclerotiorum (Lib.) de Bary op boontjie- en sojaboon-peule plaasvind (Sutton & Deverall, 1983).

Volgens Emmett en Parbery (1975) is die vorming en funksionering van appressoriums 'n belangrike deel van die infeksieproses van baie patogene fungusse. In sommige van die spesies is dit 'n voorvereiste alvorens infeksie kan plaasvind terwyl dit by ander

spesies voorkom, maar dit nie 'n vereiste vir penetrasie is nie.

#### 2.2.2.2 Ensiematiese bevordering van penetrasie van gasheerselwande.

Die komplekse struktuur en die chemiese samestelling van die selwand verseker dat dit as 'n effektiewe versperring teen die indringing van mikroorganismes dien. Fungusse kan oor spesifieke ensieme beskik wat in staat is om die polimeriese selwandkomponente af te breek. Poligalakturonase en pektienmetielgalakturonase is deel van die ensiemspektrum wat geproduseer word en wat oor die vermoë beskik om die  $\alpha$ -1,4-bindings in pektiese polimere te verbreek. (Bateman & Basham, 1976.) Dit veroorsaak strukturele verandering van die selwande tot so 'n mate dat die oorblywende polimere meer vatbaar vir afbraak is (Mount, 1978). Sellulase is 'n ensiemkompleks wat uit vier suiwer komponente bestaan en in staat is om die  $\beta$ -1,4-bindings van sellulose en hemisellulose te verbreek (Bateman & Basham, 1976).

Verskeie bevindings op ultrastrukturele vlak dui op ensiematiese penetrering van gasheerselwande. Die afwesigheid van 'n selwand aan die punt van die penetrasiehife van sekere fungusse dui daarop dat meganiese penetrasie alleen, onwaarskynlik is. Die gegolfde voorkoms van die penetrasiehife se plasmalemma dui op 'n sekreterende aktiwiteit ten opsigte van ensieme. Die elektron-digte gasheerselwand direk aangrensend tot die penetrasiehife, in vergelyking tot die res van die selwand, dui op die moontlikheid van ensiematiese selwandafbraak. (Bishop & Cooper, 1983.) Die selwand naasliggend tot die penetrasiehife toon verlies aan strukturele integriteit asook die teenwoordigheid van amorfe materiaal as moontlike produk van ensiematiese werking. Die onreëlmatige buitelyne van die penetrasiehife dui ook op die moontlikheid dat dit gedeeltes in die selwand vul waar en-

siematiese afbraak plaasgevind het. (Aist, 1976.) Die opening waardeur die penetrasiehife strek, is groter in deursnee as die penetrasiehife self wat dui op ensiematiese afbraak van die selwand (Emmett & Parbery, 1975). Patogene het soms die vermoë om veranderinge in selwande te veroorsaak selfs voordat penetrasie plaasvind (Cooper, 1981).

Die ensieme vervul nie net 'n selwandafbrekende rol om toegang tot die interne gedeeltes van die gasheer te verkry nie. Ensieme kan sekondêre funksies vervul deurdat dit vir die nekrose van selle verantwoordelik kan wees as gevolg van omvattende degradasie van selwande. (Cooper, 1981.) Endopektiese ensieme veroorsaak maserasie van weefsel wat nekrose van die weefsel as sekondêre effek tot gevolg kan hê. Die werking van die ensieme het verlies aan strukturele sterkte van die selwand tot gevolg en dit kan nie die interne druk van die sel teenstaan nie. Die onvermoë van die selwand om na behore te funksioneer, veroorsaak beskadiging van die plasmalemma en die gepaardgaande ioonlekkasie vanuit die selle. (Wheeler, 1978; Cooper, 1981.)

Harvey (1977) meld dat Pleiochaeta setosa (Kirchner) Hughes wel oor die vermoë beskik om selwande wat vooraf ensiematiese degradering ondergaan het, meganies te penetreer.

### 2.2.3 Kolonisering van die gasheer deur die patogeen

Ruppel (1973) het gevind dat tydens die infeksie van suikerbeetwortels deur Rhizoctonia solani Kühn, die kolonisering van wortelweefsel na die aanvanklike indringing vinniger tangensiaal as radiaal plaasvind. Die kolonisering word eers as suksesvol beskou indien die fungus in parasitiese verhouding met die gasheer tree, waarna patogeenese 'n aanvang neem (Goodman et al., 1967).

Indien die morfologiese en anatomiese verskille tussen verskillende volwasse weefseltipes van so aard is dat die vordering van die patogeen tydens kolonisering beperk word, bv. die endodermis kan voorkom dat die vaatweefsel gekoloniseer word, kan die fungus die hindernis oorkom deur jong ongedifferensieerde weefsel naby die groeipunte te penetreer. Vervolgens kan dit dan die volwasse weefsel bereik deur lengteverlopende groei. (Bishop & Cooper, 1983.)

Toksiene afkomstig vanaf patogene kan vir die predisponering van gasheerweefsel verantwoordelik wees alvorens kolonisering van die weefsel plaasvind (Comstock & Scheffer, 1973; Wheeler, 1981). Nie-patogeniese isolate van Bipolaris zeicola (Stout) Shoem. en B. victoriae (Meehan & Murphy) Shoem., 'n patogeen van hawer, is in staat om miellieblare in te dring waarna dit tot een of twee selle beperk word. Indien HC-toksiene, afkomstig van die patogene B. zeicola ras 1, aan die blaar toegedien word, beskik die gemelde fungusse oor die vermoë om die weefsel te koloniseer. (Comstock & Scheffer, 1973.)

### 2.3 Ultrastrukturele effek van die patogeen in gasheerselle

Die waarneembare veranderinge in die voorkoms van 'n plant in reaksie op fungusinfeksies, is 'n reflektering van verandering in die ultrastruktuur van die gasheerweefsel. Die ultrastrukturele veranderinge is die gevolg van fisiese en chemiese prosesse wat veroorsaak word deur fungusmetaboliete. (Calonge et al., 1969.)

Die ultrastrukturele veranderinge van die selinhoud is nie noodwendig negatief van aard, soos blyk uit die stimulerende effek van biotrofe parasitiese fungusse wat 'n toename in gasheer-sitoplasma, endoplasmiese retikulum, ribosome, mitochondrions en die akkumulاسie van stysel tot gevolg het. Nekrotrofe patogene het egter voor of na indringing omvattendê versteuring van die

gasheersitoplasma tot gevolg. Dit behels die vervorming, vermindering of disintegrasie van organelle. (Cooper, 1981.)

### 2.3.1 Selwande

Met die vashegting van die penetrasiestrukture aan die gasheerselwand deur middel van 'n elektrondigte amorfe laag, vind daar verwringing en swelling van die selwand plaas. Versteuring van die fibrille se normale oriëntasie, soos blyk uit die vashegting van die penetrasiestrukture van Fusarium oxysporum f. sp. pisi ras 2 aan selwande van ertjiewortelselle, vind ook plaas. Aggregasie van gasheersitoplasma vind ook in die selle aangrensend tot die ekstrasellulêre hifes plaas en die gasheerplasmalemma vertoon hoogs gevou. (Bishop & Cooper, 1983.) Perry en Evert (1983) vermeld die versteuring van die aartappelwortelselwande aangrensend aan hifes van Verticillium dahliae Klebahn net voordat indringing plaasvind.

Gedurende die penetrasieproses kan swelling en degradasie van die selwande om die penetrasiehife plaasvind (Cooper, 1981). Veranderings as gevolg van ensiematiese afbraak van die selwand behels verlies aan ultrastrukturele integriteit, die aanwesigheid van amorfe materiaal in die selwand (Aist, 1976) en die verhoogde elektrondigtheid van die gasheerselwand direk aangrensend aan die penetrasiehife (Bishop & Cooper, 1983). 'n Verhoging in elektrondigtheid van selwande en die aanwesigheid van 'n blaasagtige struktuur tussen die selwand en die plasmalemma is waargeneem by die apikale meristeem van hawerwortels wat met die toksien victorin behandel is. Selwandneerleggings het naby die plasmodesmata en lokaliteite teenoor die intersellulêre ruimtes op die binnewande ontwikkel. (Hanchey, 1981.) Die aanwesigheid van omgebuijgde selwande aangrensend aan die lokaliteit van indringing, kan dui op die meganiese aspekte van penetrasie (Aist, 1976 ;

Perry & Evert, 1983).

### 2.3.2 Selmembrane

Van die eerste manifestasies van 'n patologiese toestand in plante tydens fungusinfeksie, is die veranderinge in die aard van die selmembrane wat die permeabiliteit daarvan beïnvloed (Hislop & Pitt, 1976; Harvey, 1977). Toksiene wat as fungusmetaboliete deel uitmaak van die aanvalsmeganisme van sommige plantpatogene, het meestal veranderinge van die sitoplasmiese membrane as primêre effek tot gevolg (Hanchey, 1981). Waarneembare verandering in die voorkoms van selmembrane reflekteer strukturele en funksionele wysigings van die membraan (Goodman, 1972). Die plasmalemma kan versteur word in selle wat drie tot vier selle van die patogeen verwyderd is (Hanchey & Wheeler, 1971) wat die gevolg kan wees van metaboliete soos deur die patogeen geproduseer (Harvey, 1977).

### 2.3.3 Mitochondrions

In die wortelselle van tabakplante veroorsaak Phytophthora parasitica (Dast.) var. nicotianae (Breda de Haan) Tucker, verwronge mitochondrions in selle aangrensend aan die waarin die patogeen se houstoriums voorkom. Geen vroeë effek is op die mitochondriale kristas waarneembaar nie. (Hanchey & Wheeler, 1971.) Cooper (1981) meld dat mitochondrions na infeksie gou tekens van verandering toon, maar dat dit meer weerstand as die ander organelle teen degradering bied. Harvey (1977) het tydens die infeksie van lupienblare deur Pleiochaeta setosa gevind dat fragmentering van mitochondriale membrane en kristas van die primêre versteurings was.

### 2.3.4 Kern en sitoplasma

Die versameling van die kern en sitoplasma by die indringings-

lokus het gedurende die vroeë stadiums van indringing deur Bipolaris zeicola rasse I en II by vatbare en weerstandbiedende mielieblare plaasgevind en in aangrensende selle het die kern en sitoplasma so na as moontlik aan die area van penetrasie beweeg (Murray & Maxwell, 1975). Volgens Cooper (1981) is die kerne van geïnfecteerde selle van die laaste herkenbare selkomponente. Die meeste toksiene het min of geen verandering in die voorkoms van selkerne tot gevolg gehad nie, behalwe as die mate van sellulêre degradasie reeds gevorderd was. Die verandering wat wel waargeneem is, was koagulasie van die kern-inhoud en die vorming van vesikelagtige strukture op die kernmembraan. (Hanchey, 1981.)

## 2.4 Toksiene.

### 2.4.1 Oorsigtelike beskouing

Voordat 'n fungusmetaboliet as 'n toksien geklassifiseer kan word, moet dit primêr in staat wees om by 'n redelike konsentrasie al die simptome of sommige van die simptome te veroorsaak wat kenmerkend van die siektetoestand is (Luke & Gracen, 1972; Strobel, 1974; Daly, 1981). Die patogeen en die toksien moet spesifiek wees vir dieselfde gasheer of gasheerkompleks (Luke & Gracen, 1972) en die toksien moet noodsaaklik wees vir die patogenisiteit van die bepaalde patogeen (Scheffer & Yoder, 1972) deurdat dit primêr vir die inisiëring van die siektetoestand en -ontwikkeling verantwoordelik is (Yoder, 1980). Ander toksiese metaboliete wat van patogene afkomstig is, is sekondêre rolspelers, maar kan 'n bydrae tot die virulensie van die patogeen lewer (Wheeler, 1981).

Verwelking, chlorose, nekrose en groei-abnormaliteite is die mees algemene sigbare simptome wat met die aanwesigheid van toksiene geassosieer word. Fisiologiese simptome wat nuttig is in die aanvangsondersoek na die moontlike toksiese eienskappe van 'n

bepaalde fungusmetaboliet is ioon- of elektrolietlekkasie en die moontlike afwyking in respirasietempo. (Daly, 1981.)

Om te bepaal of 'n toksien by die inisiëring van die siektetoestand betrokke is en dat dit 'n betekenisvolle rol in die verdere verloop van patogeenese speel, moet dit aan verskeie kriteriums voldoen. Daar moet gepoog word om die aanwesigheid van die toksien in die geïnfecteerde plant aan te toon. 'n Verdere kriterium is om die korrelasie tussen vatbaarheid vir die patogeen-geïnduseerde siektetoestand en sensitiwiteit vir die toksien by verskillende kultivars van die gasheerplant te ondersoek. 'n Ondersoek na verskille in toksienproduksie in vatbare en weerstandbiedende weefsel behoort gedoen te word. Die moontlikheid of die toksien oor die vermoë beskik om geneties beheerde weerstand te oorkom, moet ondersoek word. Laastens kan gepoog word om die werking van die toksien in lewende selle te inhibeer om so vas te stel wat die moontlike rol van die toksien in patogeenese is. (Rudolph, 1976.)

#### 2.4.2 Ultrastrukturele effek van fungustoksiene

##### 2.4.2.1 Selwande

Selwandneerleggings en vesikelagtige strukture is algemene reaksies in plantweefsel wat met toksiene behandel is. 'n Verhoging in elektrondigtheid van selwande en die aanwesigheid van 'n vesikelagtige struktuur tussen die selwand en die plasmalemma is waargeneem by die apikale meristeem van hawerwortels wat met die toksien victorin behandel is. Intracellulêre selwandneerleggings naby plasmodesmata en neerleggings op dele van die binneselwande aangrensend aan intersellulêre ruimtes het daarna ontwikkel. (Hanchey, 1981.)

##### 2.4.2.2 Membraansisteme

Toksiene wat deel uitmaak van die aanvalsmeganisme van sommige plantpatogene, het meestal veranderinge van die sitoplasmiese membrane tot gevolg. Toksiene kan die permeabiliteit van selmembrane verander met die gepaardgaande elektrolietverlies. (Hanchey, 1981.) Waarneembare verandering in die voorkoms van selmembrane reflekteer strukturele en funksionele veranderinge van die membraan (Goodman, 1972). As gevolg van die invloed van die toksiene op selwande en selmembrane, kom verlies aan strukturele en osmotiese integriteit by die membraansisteem voor en kan die selle plasmolise ondergaan (Hanchey, 1981). Versteuring van die plasmalemma kan plaasvind in selle wat drie tot vier selle van die patogeen verwyderd is (Hanchey & Wheeler, 1971). Die metaboliëte afkomstig vanaf Rhizoctonia solani kan nekrose van weefsel, wat nie direk met die hifes in kontak is nie, veroorsaak tydens die infeksie van suikerbeetwortels (Ruppel, 1973). Volgens Harvey (1977) beweer Bracker en Littlefield dat die meeste parasitiese fungusse wat oor 'n vernoude penetrasiehife beskik, in staat is om gasheerselle wat verder van die hifes geleë is, te versteur. Dit blyk dat toksiene selmembrane tot so mate affekteer dat die patogeen as gevolg daarvan beter in staat is om die weefsel te koloniseer (Scheffer & Livingston, 1984).

#### 2.4.2.3 Mitochondrions

Die ultrastrukturele effek van HMT-toksien op bepaalde vatbare miellielyne is van so aard dat dit geswelde en verwronge mitochondrions, minder kristas en verlies aan digtheid van die mitochondriale matriks tot gevolg gehad het, terwyl die binneste en buitenste membrane steeds intakt vertoon (Aldrich et al., 1977; Hanchey, 1981). Soortgelyke mitochondriale afwykings word in die blaarselle van tamaties aangetref na die blootstelling daarvan aan die AL-toksien van Alternaria alternata (Fr.) Keissl.

(Park et al., 1981) asook in blaarselle van suikerbeet wat blootgestel is aan die toksien van Cercospora beticola Sacc. (Steinkamp, et al., 1981). Toksiene fungusmetaboliete kan die mitochondrions van vatbare gasheerselle benadeel aangesien die mitochondrions respiratoriese beheer verloor na dit aan die fungusmetaboliete blootgestel is (Aldrich et al., 1977).

#### 2.4.2.4 Selkerne, ribosome en endoplasmiese retikulum

Die meeste toksiene veroorsaak min of geen verandering in die voorkoms van selkerne nie, behalwe as die mate van sellulêre degradasie reeds ver gevorderd is. Die veranderinge wat wel waargeneem is, was koagulasie van die kerninhoud en die vorming van blaasagtige strukture op die kernmembraan. Die invloed van toksiene op ribosome behels aggregasie en afname van die getal ribosome. Die toksien victorin se invloed op die voorkoms van die endoplasmiese retikulum was van so aard dat dit gerangskik het as lang parallelle lamellas of as konsentriese windings. (Hanchey, 1981.)

#### 2.5 "Helminthosporium" toksiene

Ses Bipolaris spp. wat selde ander plante as lede van die Gramineae parasiteer, is in staat om toksiene te vorm waarvan sommige tot 'n hoë mate oor die vermoë beskik om siektesimptome by die gasheer te induseer, terwyl ander 'n minder belangrike rol in patogense vervul. Die patogene is Bipolaris victoriae (Meehan & Murhpy) Shoem. (= Helminthosporium victoriae), B. sorokiniana (Sacc.) Shoem. (= H. sativum), B. oryzae (Breda de Haan) Shoem. (= H. oryzae), B. zeicola (Stout) Shoem. (= H. carbonum), B. maydis (Nisikado & Miyake) Shoem. (= H. maydis) en B. sacchari (E. Butler) Shoem. (= H. sacchari). (Luke & Gracen, 1972.) Volgens Comstock en Scheffer (1973) is die toevoeging van HC-toksien van B. zeicola ras 1 in staat om die blaarweefsel tot so 'n mate

te predisponer dat 'n nie-patogeniese B. zeicola asook B. victoriae, 'n patogeen van hawer, die weefsel kan koloniseer. Soortgelyke bevindings is met 'n patogeniese isolaat van B. victoriae op hawerblare verkry, wat dus die hipotese ondersteun dat die toksiene noodsaaklik is vir die suksesvolle infeksie van vatbare gasheerweefsel (Yoder, 1972).

Die Bipolaris spp. sekreter twee algemene tipes toksiese verbindings naamlik peptiede wat spesifiek in hul invloed is en terpenoïede wat nie spesifiek in hul invloed is wat dit op 'n spesifieke gasheerplant uitoefen nie. Dit blyk dat die peptiede betrokke is by die primêre fisiologiese versteurings wat tydens patogenese ontstaan. Die terpenoïede oefen later tydens patogenese hul invloed uit wat tot gevolg het dat die spesifieke toksien deel uitmaak van 'n spektrum van faktore wat die simptome induseer. (Luke & Gracen, 1972.)

## HOOFSTUK DRIE

### MATERIAAL EN METODES

#### 3.1 Isolering en vermeerdering van Exserohilum pedicellatum

Exserohilum pedicellatum is uit mieliewortels met letsels geïsoleer met behulp van die enkelkonidiumtegniek (Booth, 1971). Konidiums van reinkulture wat met die metode bekom is, is op mediums van mieliemeelekstrak-agar, waarin gehomogeniseerde en geoutoklaveerde mieliewortelweefsel was, in 90mm Petri-bakkies uitgeplaat. Die groei van die onderskeie konidiums in elke kultuur is vir identiese groei gemonitor en indien verskille in die groeiwyse van die onderskeie kulture in dieselfde medium voorgekom het, is die isolate van E. pedicellatum nie in enige eksperimentele prosedure gebruik nie. Die kulture is as voorraadkulture gebruik. Subkulture is op halfsterkte aartappeldekstrosegagar gemaak vir die verkryging van konidiums vir die verskillende aspekte van die ondersoek.

Die inokulum is vermeerder deur reinkulture van E. pedicellatum vir sewe dae op halfsterkte ADA-groeimediums in petribakkies in 'n inkubator (Labotec Term-O-Mat) te kweek by 30°C. Vir die voorbereiding van inokulum is die konidiums van 'n kultuur in 10ml van die steriele saailing-voedingsmedium (kyk 3.4 en bylaag M) gesuspendeer deur die vloeistof op die oppervlak van die kulture te giet en dit met 'n steriele spatel af te skraap. Die suspensie is in 'n steriele maatsilinder gedekanteer en goed geskud om klompvorming te vermy. Dit was onnodig om 'n benattingsmiddel by te voeg.

Alle infeksies is met 'n konidiumgetal van 50 kondiums per kubieke sentimeter vermikuliet gedoen. Die konidiumgetal in die konidiumsuspensie is met 'n Spencer Bright Line-hemasitometer

bepaal (Booth, 1971) en met die steriele saailing-voedingsoplossing verdun soos benodig.

### 3.2 Metode om steriele mielie-saailinge te kweek

Voorlopige eksperimente het getoon dat mieliesaailinge wat met 0,1% natriumhipochloried gesteriliseer is, steeds met Fusarium moniliforme Sheldon of met 'n ongeïdentifiseerde Acremonium sp. Link op 'n simptomeelose wyse geïnfekteer is. Hierdie probleem is oorkom deur die volgende prosedure.

Vir die aksieniese kweeking van mieliesaailinge vir alle ultrastrukturele en ligmikroskopiese studies is die mieliesade as volg behandel :

- (i) Was in gedeïoniseerde water vir 4 uur by 18 - 20°C.
- (ii) Plaas in water vir 5 minute by 60°C (Daniels, 1983).
- (iii) Plaas in 0,1% HgCl<sub>2</sub> vir 4 minute en dra oor na laminêre vloekas waar alle handeling onder steriele omstandighede uitgevoer word.
- (iv) Was drie maal in steriele gedeïoniseerde water vir 10 minute by kamertemperatuur en laat droog word in die laminêre vloekas waarna die houër met alkohol-gesteriliseerde kleefplastiek verseël is.
- (vi) Bewaar in koelkas by 4°C tot sate benodig word.

Deur die verloop van die hele studie is van dieselfde voorraad mieliesade van die onderskeie lyne gebruik gemaak.

### 3.3 Voorbereiding van 'n steriele soliede groeimedium

Vermikuliet van die MCU klas (Micronized Products, Doornfontein Johannesburg) is in hoeveelhede van 920g in hittebestande sellofaan baksakkies verseël waarna dit vir agt uur by 110°C in 'n oond gesteriliseer is. Die sakkies is slegs in die laminêre

vloeikas oopgemaak soos benodig. Die spesifieke graad is gekies nadat verskeie grade geanaliseer is en dit geblyk het dat MCU die meeste ooreenstem met die deeltjiegrootte-samestelling van 'n rooi sand-leem grond wat ook geanaliseer is (kyk bylaag A). Die oogmerk was om 'n herhaalbare medium te gebruik wat strukturele ooreenkomste met grond, wat geskik vir mielieverbouing is, het. Die vermikuliet is belangrik geag in die keuse van 'n soliede groeimedium vir die studie, om die beskadiging van die wortels tydens verwydering uit die medium tot 'n minimum te beperk.

#### 3.4 Vloeibare voedingsmedium vir die mieliesailinge

As voedingsmedium is 'n gewysigde Hoagland-oplossing (kyk bylaag M) gebruik wat deur Hageman et al. (1961) ontwikkel en ook deur Grobbelaar (1963) gebruik is vir die kweek van mielies onder kunsmatige omstandighede.

Voorraad-oplossings van die makro-elemente en die mikro-elemente is in 'n yskas bewaar. In alle gevalle is die voedingsoplossing met gedeïoniseerde water opgemaak en aangesuur met swaelsuur tot pH 4,5. Die finale voedingsoplossing is 20 minute in 'n outoklaaf gesteriliseer en na die steriele omgewing van 'n laminêre vloeikas oorgedra. Die voedingsoplossing is steriel toegedien. (Grobbelaar, 1963).

#### 3.5 Kweking en inokulasie van proefplante

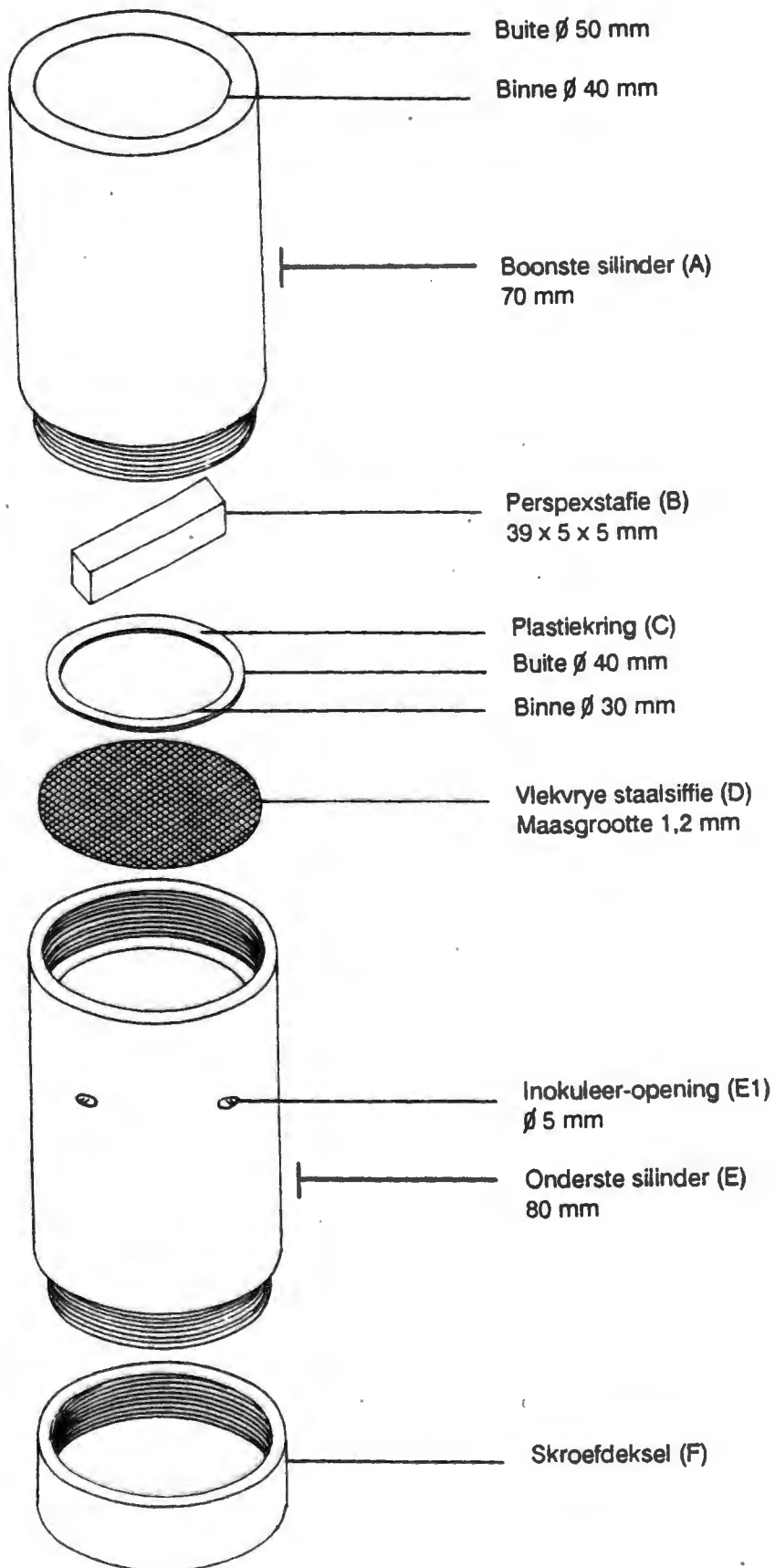
Die plante is gekweek in keëlvormige plastiekpotte met 'n deursnee van 152 mm waarvan die inhoudsmaat 1150 cm<sup>3</sup> is. Die houers is deeglik gewas en in die laminêre vloeikas met 96% etanol afgespoel. Die voorafbepaalde volume van die konidium-suspensie in die voedingsoplossing is daarna by 920g vermikuliet gevoeg en deeglik vermeng in die planthouer. Die vermikuliet is tot 50% van die veldkapasiteit benat. Hiervoor was 0,31cm<sup>3</sup>

voedingsoplossing per 1,0g vermikuliet benodig ( $285\text{cm}^3/\text{houer}$ ) aangesien die waterhouvermoë van die spesifieke graad van die vermikuliet  $0,62\text{cm}^3$  per gram is. Hierdeur is verseker dat aerenchiem nie in die korteksweefsel van die mieliwortels vorm nie aangesien vloeistof-versadigde soliede groeimediums die vorming daarvan tot gevolg het (Drew et al., 1979) en dit verkeerde interpretasie van die resultate tot gevolg kon hê as gevolg van die skyndegradasie van die korteksparenchiem.

Vir kontroledoeleindes is plante gekweek sonder dat dit geïnfekteer is.

Sade van mielielyne A471W en AX305W (Somergraansentrum Potchefstroom) is gesteriliseer soos in 3.2 beskryf en 15mm diep in die vermikuliet wat vooraf met E. pedicellatum geïnfesteer is, geplant. Vyf sade van elke mielielyn is in elke houer geplant. Die vermikuliet is met die restante gedeelte van die benodigde  $285\text{cm}^3$  voedingsoplossing benat. Vir die kontrole is ongeïnfesteerde vermikuliet gebruik. Hierna is die houer bedek met nuwe kleefplastiek wat met 96% etanol gesteriliseer is. Sodra die punt van die koleoptiel na opkoms naby aan die plastiek was of daaraan geraak het, is die kleefplastiek geprik sodat die saailing deur die klein opening kon groei. Die doel van die kleefplastiek was om die proefsistiem so steriel moontlik te hou en dus die aanwezigheid van toevallige saprofitiese of patogene luggedraagde fungusse tot die minimum te beperk. Die plastiekbedekking verminder ook vogverlies wat variasie in die voginhoud tot die minimum beperk. Die houers is met die aanvang van elke eksperiment geweeg en daarna is massa-bepalings daaglik gedoen en is die massa tot die oorspronklike aanvul met steriele voedingsoplossing.

**Figuur 3.1 Wortelinokulering-toestel**



Die plante is gekweek by 14 uur daglengte by 25°C en 60% RH en 'n nagtemperatuur van 20°C en RH 80% in 'n groeikabinet (Conviroon Model EF7). Volgens Shepherd (et al., 1967) is die patogeen se invloed op die mielieplante die grootste by die spesifieke dagtemperatuur.

### 3.6 Wortel-inokuleringstoestel (WI-toestel)

'n Spesiale apparaat is ontwerp om geselekteerde wortels of dele van wortels effektief met die minimum fisiese beskadiging te inokuleer en te versamel vir die voorbereiding daarvan vir elektronmikroskopie (kyk fig. 3.1). Die sisteem was noodsaaklik om die fisiese beskadiging van die epidermisselle van die wortels wat tydens die versameling van die wortelmateriaal plaasvind as dit uit die vermikuliet verwyder word, te voorkom. Die toestel vergemaklik ook die monitering van die geïnfekteerde wortels gedurende die verloop van die eksperiment.

Die toestel bestaan uit twee deursigtige Perspexbuisse (A en E) met 'n binne-deursneë van 40mm wat aanmekaar vasskroef. Die onderste opening van die toestel word met 'n Perspexdeksel toegeskroef (F). 'n Vlekvrye staalsiffie (D) met 'n 1,2mm maasgrootte word in die middel waar die twee buise aanmekaar geskroef word, geplaas. Die plastiekring (C) op die siffie verseker dat die wortels sentraal deur die siffie groei en die perspexstafie (B) op die ring het tot gevolg dat die wortels deur die siffie groei en nie in die rondte bo die siffie nie. Vier openinge (E1) met 'n deursneë van 5mm wat reghoekig teenoer mekaar geleë is en 5mm onder die sifskeiding voorkom, word gebruik vir die inokulering van die wortels.

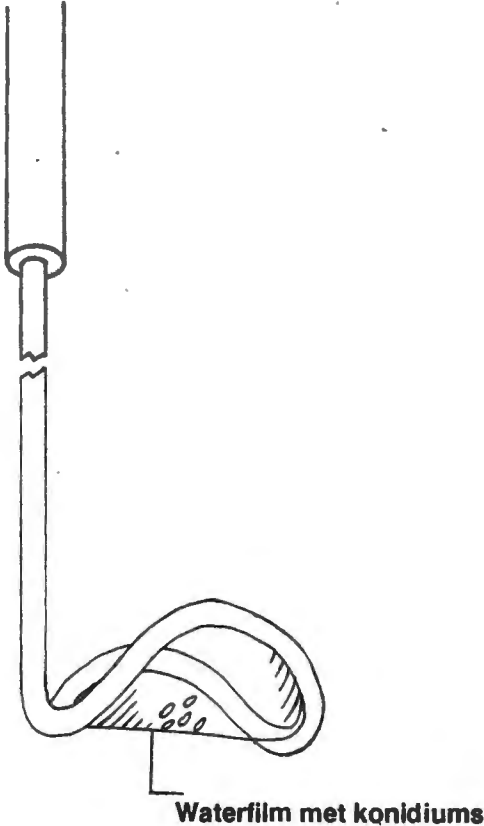
Die onderste buis (E), met deksel (F), wat onder steriele toestande aangeskroef is, is tot 'n hoogte van 65mm met ge-

steriliseerde vermikuliet gevul waarna dit met die steriele voedingsoplossing benat is tot 50% van die veldkapasiteit. Die vlekvrystaalsiffie (D) is daarna in posisie geplaas en die boonste buis (A) opgeskroef. Die plastiekring (C) en Perspexstafie (B) is op die siffie geplaas. Die boonste buis is met vermikuliet gevul en met die voedingsoplossing soos hierbo benat. In die opgestelde toestel is daar 'n lugruimte van 10mm tussen die siffie en die onderste vermikuliet. Die steriele mieliesade (kyk 3.2) is in die boonste buis geplant. Die openinge in die onderste buiswand is met alkohol-gesteriliseerde parafilm bedek. Die massa van die houers is bepaal vir die handhawing van 'n konstante voginhoud tydens die verloop van die eksperiment. Om die wortels in die donker te hou, is die hele silinder in swart plastiek toegedraai. Huishoudelike kleefplastiek wat met alkohol gesteriliseer is, is oor die opening geplaas om die invloed van luggedraagde fungusse sover moontlik uit te skakel. Die WI-toestelle met die proef- en kontroleplante is in die groeikabinet (Convicon Model EF7) geplaas totdat die wortels deur die lugruimte na die onderste vermikuliet gegroei het. Die toestande in die groeikabinet was 14 uur daglengte by 25°C en 60% RH en 'n nagtemperatuur van 20°C en RH 80%.

Die voginhoud van die gevulde WI-toestelle is daagliks deur massabepalings gemonitor en aangevul. Die benodigde hoeveelheid voedingsoplossing is gehalveer en onder steriele toestande onderskeidelik aan die twee vermikuliet-gevulde dele (A en E) toegedien. Die voedingsoplossing is deur die inokuleringsopening aan die onderste vermikuliet toegedien.

Die inokulering van die wortels wat deur die lugruimte groei, is met behulp van 'n inokuleerogier van nikkelchroomdraad gedoen. Die ogier is reghoekig tot die steel gebuig. Die ronde lus is effens

**Figuur 3.2 Gewysigde inokuleerogje vir gebruik met die WI-toestel**



gebuig sodat dit van die kant halfmaanvormig vertoon (kyk fig. 3.2). Die doel van die gebuigde lus is om inokulasie van die wortels te vergemaklik sonder dat die inokuleerlus kontak met die worteloppervlak maak. As die gebuigde ogie in vloeistof gedoop word, vorm 'n film op so 'n wyse dat dit moontlik is om die waterfilm teen die wortel te druk sonder dat die ogie daarmee kontak maak.

Om die wortels te inokuleer, is die inokuleerogie in 'n inokulum-suspensie gedoop waarvan die konidiumkonsentrasie sodanig is dat die film wat in die ogie gedra word, ongeveer vyf konidiums bevat. Die voedingsmedium van die proefplante is as suspensievloeistof vir die konidiums gebruik. Die inokulasie is met die inokuleerogie deur enige van die openinge (E1) in die onderste buis (E) op geskikte wortels gedoen.

3.7 Versameling en voorbereiding van plantmateriaal vir fiksering  
Die proef- en kontrole materiaal is op 4, 7, 11, 14, 18, 21, 24 en 28 dae na planting vir mikroskopiese ondersoek gemonster. Die aanplanting, inokulering en monstering van materiaal is in twee siklusse herhaal. Wortelpunte, tussengedeeltes en mesokotielweefsel van die saailinge is versamel.

Van alle wortelmateriaal wat vir mikroskopiese ondersoeke versamel is, is wortelsegmente op halfsterkte ADA-groeimedium geplaas om te kontroleer vir die aanwesigheid van moontlike kontaminante.

Die potte met die mieliesaaillinge is in water onderdompel sodat die vermikuliet totaal versadig is. Daarna is die plant versigtig verwyder. Alle oorblywende vermikuliet is versigtig afgespoel. Die wortels is so min moontlik beskadig en indien dit enige

tekens van beskadiging getoon het, is dit nie gebruik nie. Wortels met letsels is in fikseermiddel afgesny.

Die vordering van die siekte in die wortelinokuleringsstoestel (fig. 3.1) is op 'n gereelde basis gemonitor om die graad van infeksie te bepaal. Die materiaal is 2, 4, 6, 12, 24, 48, 96, en 144 uur na inokulering vir mikroskopiese ondersoek gemonster. Vir die monsterring van die materiaal vir mikroskopiese ondersoek is die prop (F) van die onderste silinder afgeskroef en die vermikulier versigtig uitgespoel. Daarna is die onderste silinder (E) afgeskroef sodat die wortels en die geïnfekteerde gedeeltes blootgelê is. Die wortels is afgesny en direk in die fikseeroplossing geplaas waarna die dele met letsels met 'n lem-metjie afgesny is.

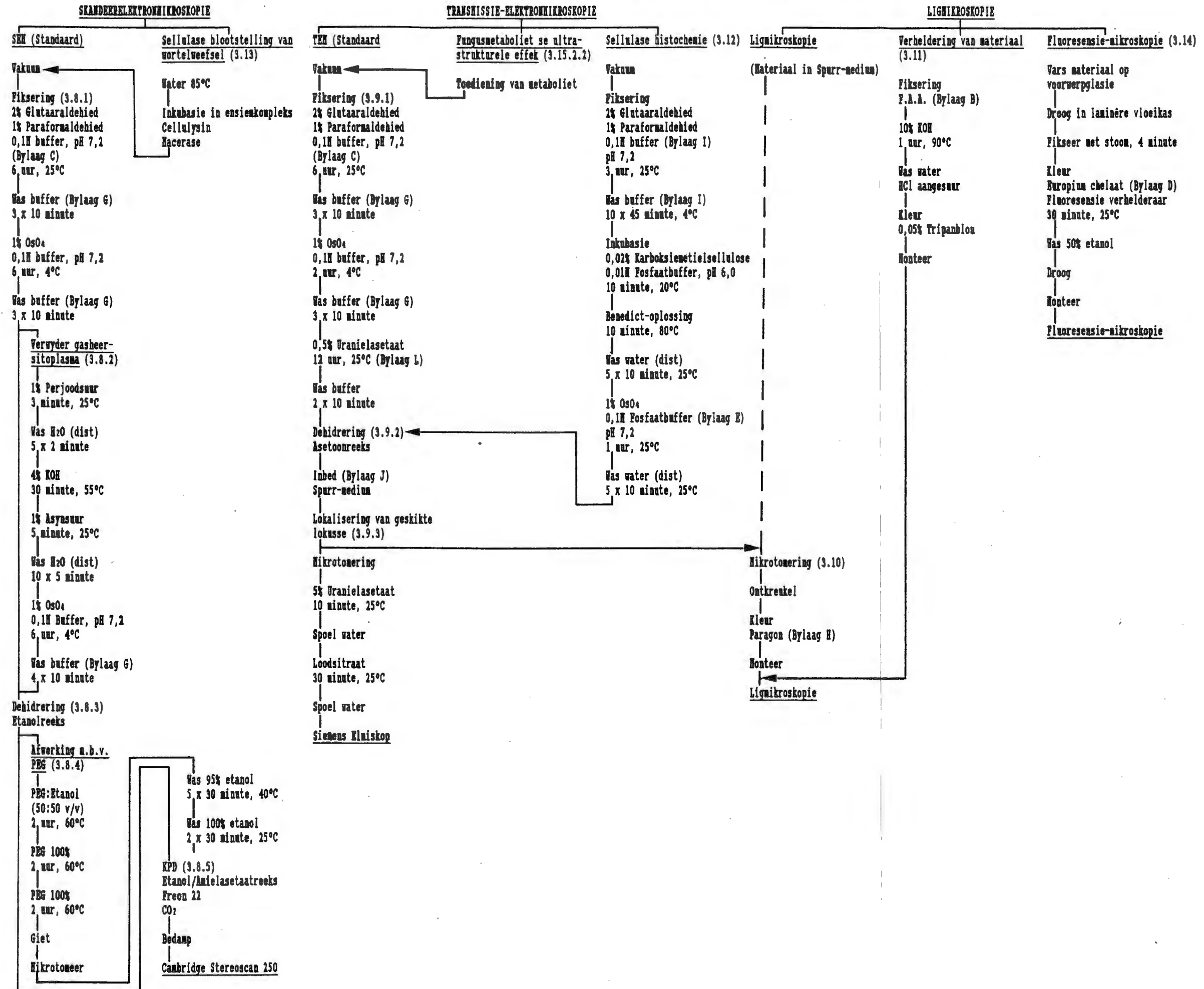
Die geselekteerde wortels wat van die pothouers en die WI-toestel verkry is, is in die fikseermiddel geplaas. Die wortels is op was in 'n petri-bakkie geplaas, met fikseermiddel bedek en gesny in lengtes van ongeveer 1mm.

### 3.8 Voorbereiding vir skandeerelektronmikroskopie (SEM)

#### 3.8.1 Fiksering van die materiaal (Kyk Vloeidiagram Fig. 3.3)

Wortelgedeeltes in die fikseermiddel is in 'n vakuum dessikator aan vakuum onderwerp om alle lug te verwyder. Die materiaal is daarna vir ses uur in 'n kombinasie van 2% glutaaraldehyd en 1% paraformaldehyd fikseer by 'n temperatuur van 25°C. Die materiaal is vervolgens drie maal by kamertemperatuur met 0,1M Na-kakodilaatbuffer (pH 7,2) (kyk bylaag G) gewas. Post-fiksering is met 1% osmiumtetroksied in die 0,1 M Na-kakodilaatbuffer (pH 7,2) vir ses uur by 4°C gedoen. Die post-fiksering is deur 'n wasproses van drie maal tien minute in die buffer opgevolg. (Campbell & Drew, 1983).

FIGUUR 3.3 : SCHEMATIESE VOORSTELLING VAN MIKROSKOPIESE TECHNIKE AANGEWEND



### 3.8.2 Verwydering van intrasellulêre sitoplasma (Kyk Vloei-diagram Fig. 3.3)

Die helfte van die gefikseerde materiaal is in die bufferwasmiddel gelaat. Om die sitoplasma van die oorblywende monsters te verwyder, is die materiaal in 1% perjoodsuur by 25°C en in 4% KOH by 55°C geplaas. Om die versagte weefsel te verhard, is dit weereens in 1% osmiumtetroksied in 0,1M Na-kakodilaatbuffer vir ses uur by 4°C gelaat waarna dit vier maal vir 'n totale tyd van 40 minute in 0,1M Na-kakodilaatbuffer gewas is. (Kinden & Brown, 1975).

### 3.8.3 Dehidrering van materiaal (Kyk Vloei-diagram Fig. 3.3)

Al die materiaal wat aanvanklik gefikseer is, was op die stadium in die buffer. Die monsters is daarna met behulp van 'n etanolreeks gedehidreer. Die monsters is vir 30 minute in elk van die volgende oplossings gelaat. Die etanolreeks het bestaan uit 20, 40, 60, 80, 95 en 100% etanol (Kinden & Brown, 1975).

### 3.8.4 Afwerking van materiaal met behulp van poli-etileenglikol vir SEM (Kyk Vloei-diagram Fig. 3.3)

Van die voorbereide materiaal is in poli-etileenglikol (PEGS) met 'n molekulêre massa van 6000 ingebed. Dit is in hoofsaak volgens die metodes van Jones (1981) en Nagele et al. (1984) gedoen.

Die materiaal is geïmpregneer deur die houers in 'n kabinet by 60°C te plaas vir twee uur. Nadat die materiaal deeglik deur die PEG geïmpregneer is, is dit in plat rubbergietsukke in die vereiste posisies gemanipuleer waarna dit toegelaat is om stadig af te koel deur die verhitte kabinet waarin die werk gedoen is, af te skakel (Nagele et al., 1984). Die vinnige afkoeling by -15°C, soos deur Jones (1981) aanbeveel, het tot gevolg gehad dat

van die materiaal distorsie ondergaan het. Vinnige afkoeling het ook tot gevolg gehad dat die PEG-blokkies bros geword het (Wolosewick, 1980), wat die vooraf afwerking met 'n lemmetjie benadeel het en dit is om die rede nie ingesluit in die prosedure nie.

Omdat PEG baie vinnig by afkoeling stol, is die manipulerings van materiaal in 'n temperatuurreguleerbare kabinet (Heraeus) met 'n Perspex binnendeur met twee werksopeninge gedoen. Alle apparaat wat tydens die voorbereiding van die materiaal gebruik is, is in die kabinet gehou om afkoeling van die PEG te voorkom.

Die PEG-blokkies is aanvanklik met 'n lemmetjie afgewerk en daarna in 'n ultramikrotroom met 'n droë glaslem afgewerk tot op 'n bepaalde vlak deur gereeld van die sneë in water te monteer en onder 'n ligmikroskoop te ondersoek. Die laaste tien sneë was 0,25µm tot 0,5µm dik en is met 'n nuwe lem gedoen. Nadat die materiaal wat ingebed is tot op 'n geskikte vlak afgewerk is, is die PEG daaruit verwyder deur dit in 95% en 100% etanol te was (kyk Vloeidiagram Fig. 3.3) (Nagele et al., 1984).

### 3.8.5 Kritiese punt droging

Die monsters wat aanvanklik in die PEG ingebed was, is saam met die ander oorblywende monsters in 'n etanol-amielasetaatreeks gedehidreer. Die etanol-amielasetaatreeks het uit 30, 50, 70, 90 en 100% amielasetaat bestaan en die monsters is vir tien minute in elke oplossing gelaat. (Kinden & Brown, 1975).

Die monsters is vanuit die 100% amielasetaat na Freon 22 oorgeplaas waarna kritiese punt droging met CO<sub>2</sub> gedoen is. Die gedroogde monsters is op 'n knopie met behulp van hegmiddel wat oor 'n silwerbasis beskik en wat elektriese geleiding verbeter,

vasgeplak. Die plantdele op die knopie is daarna met koolstof blitsbedamp ( $\pm$  twee sekondes) sowel as met goud-paladium (drie maal vir drie minute, stroomsterkte: 5mA) bedamp.

Die skandeerelektronmikroskopiese ondersoek is met behulp van 'n Cambridge Stereoscan 250 by 10 KV gedoen.

### 3.9 Voorbereiding van materiaal vir transmissie-elektron- (TEM) en ligmikroskopie

#### 3.9.1 Fiksering van plantmateriaal (Kyk Vloeidiagram Fig. 3.3)

Die materiaal is in dieselfde fikseermiddel as wat vir skandeerelektronmikroskopie (3.8.1) gebruik is, gesny en in 'n vakuum dessikator aan vakuum onderwerp. Die monsters is in die fikseermiddel gelaat vir ses uur by 25°C. Post-fiksering met 1% osmium-tetroksied in 0,1M Na-kakodilaatbuffer is vir twee uur by 4°C gedoen. Na die materiaal in 0,1M Na-kakodilaatbuffer gewas is, is dit na 0,5% uranielasetaat (kyk bylaag L) oorgeplaas by 25°C. (Campbell & Drew, 1983).

#### 3.9.2 Dehidrering van materiaal

Die dehidrering is met 'n aseton-reeks gedoen wat uit 20, 50, 70, 90 en 100% aseton saamgestel is. Die materiaal is vir 30 minute in elke oplossing van die reeks gelaat. Die finale dehidrering is met 100% anhidriese aseton gedoen. (Campbell & Drew, 1983).

Die plantmateriaal is daarna in Spurr-inbedmedium (kyk bylaag J) ingebed (Coetzee, 1982).

#### 3.9.3 Lokalisering van lokusse, mikrotomering en kleuring van materiaal

Die metode van Zeyen en Bushnell (1981) is aangepas vir

lokalisering van geskikte lokusse en om die mikrotomering van materiaal te bespoedig. Die materiaal in die Spurr-inbedmedium is onder 'n disseksiemikroskoop ondersoek vir die aanvanklike seleksie van materiaal. Die blokkie is opeenvolgend met 220, 400 en 1200 waterskuurpapier tot so na moontlik aan die plantmateriaal afgewerk. Die blokkies is daarna met 'n ultrafyn poleerpasta op sagte papier gepoleer. Immersie-olie (Zeiss) is op 'n voorwerpglasie geplaas en die blokkie is daarop geplaas met die vlak wat ondersoek moet word na bo. Immersie-olie is op die blokkie geplaas waarna dit bedek is met 'n dekglasie. Die materiaal is daarna met 'n ligmikroskoop ondersoek waarvan die objektiewe se werkafstand groter as 3mm is. As geskikte lokusse gevind is, is die posisie daarvan met 'n skerp voorwerp aan die wand van die blokkie gemerk. Voor verdere hantering is alle olie verwyder. Die blokkie is daarna met 'n lemmetjie afgewerk tot naby aan die merkie wat gemaak is waarna verdere sneë met 'n Reichert-Jung ultramikrotoom gemaak is.

Vir TEM is ultra-dun goue sneë ( $0,05 - 0,2\mu\text{m}$  gesny en met 300 maas objekstiffies opgetel. Die plantmateriaal is tien minute met 5% uranielasetaat gekleur waarna dit drie maal in dubbelgedistilleerde water in drie aparte bekere gespoel is. (Coetzee, 1982). Die seksies is vervolgens vir 30 minute op loodsitraat laat dryf waarna dit drie maal in dubbelgedistilleerde water in drie aparte bekere gespoel is (Reynolds, 1963).

Die sneë is daarna met behulp van 'n Siemens Elmiskop transmissie-elektronmikroskoop ondersoek.

### 3.10 Mikrotomering en montering van materiaal in hars vir ligmikroskopie

Vir ligmikroskopie is sneë van  $1,0$  tot  $1,5\mu\text{m}$  gesny. Kreukels en

distorsie in die sneë wat vir ligmikroskopie aangewend word, is volgens die metode van Chandler en Schoenwolf (1983) voorkom. Dit is voorkom deur die etsing van voorwerpglasies vir 'n tydperk van een uur in 'n oplossing van 10% kalsiumdichromaat en 10% gekonsentreerde swaelsuur waarna dit met gedistilleerde water afgespoel is. Die sneë wat verkry is, is oorgedra na die behandelde voorwerpglasies waarna dit oornag op 'n warm plaat gelaat is by 75°C.

Die gemonteerde sneë is met 'n druppel Paragon-kleurstof (kyk bylaag H) bedek en oor 'n vlam gehou tot die rand van die kleurstof begin opdroog en goudkleurig vertoon het. Die oormaat kleurstof is na die kleuringstydperk eers met lopende water afgespoel, en daarna met gedistilleerde water en toegelaat om droog te word (Coetzee, 1982) waarna dit met Entellan gemonteer is.

### 3.11 Verheldering en kleuring van wortels vir ligmikroskopie (Kyk Vloediagram Fig. 3.3)

Die metode is gebruik om vinnige beramings van die mate van infeksie te maak. Dit is ook gebruik in die voorlopige ondersoek van materiaal om die interpretasie van die elektronmikroskopiese ondersoek te vergemaklik. Die geïnfekteerde materiaal wat verhelder moes word, is in F.A.A. (kyk bylaag B) fikseer en bewaar soos benodig (Coetzee, 1982). Die materiaal is in 10% KOH by 90°C verhelder en met 0,05% tripanblou (Eng. trypan blue) in laktofenol by ongeveer 90°C vir vyf minute gekleur. Die verhelderde materiaal is op 'n voorwerpglasie in laktofenol gemonteer vir ligmikroskopiese (Olympus BH-2) ondersoek. (Phillips & Hayman, 1970).

### 3.12 Sellulase-histochemie van geïnfekteerde wortelweefsel met transmissie-elektronmikroskopie (Kyk Vloediagram Fig. 3.3)

Die metode van Bal (1974) is toegepas om vas te stel of die ensiem sellulase, soos deur die patogeen geproduseer, in die geïnfekteerde materiaal voorkom en om die lokaliteit daarvan in die gasheerselle te bepaal. Die geïnfekteerde en kontrole-materiaal is met 1% paraformaldehid en 2% glutaaraldehid in 0,1M Sörensen-fosfaatbuffer (kyk bylaag I) met 'n pH 7,2 gefikseer.

Vorbereiding van die materiaal vir transmissie-elektronmikroskopie is volgens die metodes soos beskryf in 3.9.1, gedoen.

### 3.13 Blootstelling van gasheerweefsel aan sellulase en die skandeerelektronmikroskopie daarvan

Die doel van die behandeling van die geïnfekteerde gasheerweefsel met selwandafbrekende ensieme, was om vas te stel of die patogeen enige strukture het wat nie met die ander elektronmikroskopiese tegnieke aangetoon kon word nie. Die oogmerk was om die selwande te verwyder en om sodoende die onderliggende fungusstrukture bloot te lê.

Vir hierdie ondersoek is wortels met die WI-toestel geïnokuleer met konidiums van die patogeen. Die wortels is agt dae na inokulasie gemonster. Die materiaal is aanvanklik vir 10 minute in warm water by 85°C geplaas om die patogeen te dood sodat dit nie verder kon ontwikkel tydens die inkubasieperiode met die selwandafbrekende ensieme nie. Die afbraakprodukte kan deur die fungus as addisionele voedingsbron benut word. Dit sou dus atipiese groei van die patogeen tot gevolg hê.

Die geïnfekteerde gasheerweefsel is vir 48 uur by 30°C in 'n ensiemoplossing geplaas. Die ensiemoplossing het bestaan uit 7,5%

Cellulysin (Calbiochem-Behring) en 2,5% Macerase (Calbiochem-Behring) in MES-buffer (Utrol <sup>TM</sup>) by pH 5,2. Daar was van elk van die ensieme 3000 eenhede in elke houer met materiaal (Glimelius, 1984). Geen chitinase het in die ensiemkomplekse voorgekom nie. As kontrole is ongeïnfekteerde materiaal ook volgens die prosedure behandel.

Na inkubasie is die materiaal gefikseer en voorberei (3.8.1) vir skandeerelektronmikroskopie. Tydens die voorbereiding is die sitoplasma soos voorheen beskryf uit die oorblywende weefsel verwyder om alle moontlike fungusstrukture bloot te lê.

### 3.14 Fluoresensie-mikroskopie (Kyk Vloeidiagram Fig. 3.3)

Die doel van die fluoresensie mikroskopie was om die behoud en mate van vitaliteit van die fungushifes op die worteloppervlak aan te toon nadat infeksie en kolonisasie van die kortekswaefsel reeds plaasgevind het. Vir die ondersoek is wortels wat in die WI-toestel geïnfekteer is, gebruik.

Dun wortels is intakt gehou terwyl die wortelepidermis en 'n dun laag kortekswaefsel van die dikker wortels gemonster is. Die wortelwaefsel is op 'n voorwerpglasie, met die epidermis na bo gemonteer. Die materiaal is nie bedek nie. Die differensiële kleurmiddel het bestaan uit europium chelaat (europium(III) tionieltrifluorasetonaat) en 'n fluoresensie verhelderaar (4,4'-bis(4-analien-6-bis(2-hidroksi-etiel)amino-5-triasien-2-alamien)2,2'-stilbeen disulfoon suur) (kyk bylaag D). (Johnen, 1978). Die mikroskopiese ondersoek is gedoen met 'n Reichert-Jung Polivar-mikroskoop met 'n kwikdamp ligbron. 'n IL BP 330 - 380 eksitasiefilter en 'n U1 LP 418 afskermingsfilter is gebruik.

### 3.15 Ondersoek na die moontlike produksie van 'n fungusmetaboliet

deur die patogeen

### 3.15.1 Produksie en ekstrahering van 'n metaboliet afkomstig van die patogeen

Die doel van die deel van die ondersoek was slegs om 'n aanduiding te kry of E. pedicellatum enige, moontlik toksiese, metaboliete produseer wat 'n bydrae tot die simptomatologie lewer.

Vir die metabolietproduksie is 200ml van die voorbereide vloeibare medium (kyk bylaag K) in elk van tien 1000ml kegelflesse geplaas en die opening met watte en aluminiumfoelie bedek waarna dit vir 20 minute in 'n outoklaaf gesteriliseer is. Die inokulasie is in die laminêre vloekas gedoen. Die flesse is steriel verseël en na die groeikabinette (Labotec Term-O-mat) oorgeplaas en gelaat vir 21 dae by 30°C (Pringle en Scheffer, 1963 ; Bhullar & Daly, 1975). Die temperatuur word beskou as die optimum vir ontkieming en groei van E. pedicellatum (Shepherd et al., 1967).

Die ekstrahering van die fungusmetaboliet is volgens die metode van Pringle en Scheffer (1967) gedoen. Die gekonsentreerde vloeistof met die fungusmetaboliet is na ekstraksie by 4°C geberg tot benodig.

Die metaboliethoudende medium is na inkubasie voorlopig getoets om te bepaal of daar moontlike ooreenkomste tussen die toksien van Helminthosporium carbonum en die metaboliet van E. pedicellatum is. Na die kultuurvloeistof deur 'n gaasdoek en filtreerpapier filtreer is, was dit geelbruin van kleur met 'n geelgroen fluoressensie onder ultravioletlig en het oormatig geskuim as dit geskud is. Die pH van die medium het gedaal van 5,4 na 4,0. Die gegewens het ooreenkoms getoon met die data van Pringle en Scheffer (1967).

### 3.15.2 Blootstelling van materiaal aan die fungusmetaboliet

#### 3.15.2.1 Bepaling van die invloed van die fungusmetaboliet op ontkieming en saailinggroei

Om te bepaal of die fungusmetaboliet toksies kan wees, is die gekonsentreerde metaboliet verdun tot 'n verhouding van 1:500 met gedistilleerde water. Dertig mieliesade van elke lyn wat volgens die metode in 3.2 behandel en gesteriliseer is, is in groot Petri-bakkies (125mm deursnee) geplaas en met die metaboliet benat. In elke bakkie is 'n gesteriliseerde filtreerpapier geplaas wat met 3ml van die verdunde metabolietoplossing benat is. Bo-op die filtreerpapier is in elke bakkie 10 steriele mieliesade geplaas. Die Petri-bakkies is in plastieksakkies geplaas en verseël waarna dit in 'n groeikabinet (Labotec Term-O-mat) by 25°C vir 7 dae geïnkubeer is. As kontrole is dieselfde prosedure gevolg deur steriele gedistilleerde water in plaas van metabolietoplossing te gebruik. Die wortellengte en -massa asook die gesamentlike lengte en massa van die mesokotiel en die koleoptiel is na die inkubasieperiode gemonitor. Die verkrygte data is volgens die Newman-Keuls-toets statisties verwerk.

#### 3.15.2.2 Onderzoek na die effek van die fungusmetaboliet op die ultrastruktuur van wortelselle

Van die materiaal wat tydens die ontkiemingstoets aan die fungusmetaboliet blootgestel is, is vir transmissie-elektronmikroskopie (kyk 3.9 en fig. 3.3) voorberei. Addisionele blootstelling van wortels aan die metabolietoplossing is met behulp van die WI-toestel gedoen deur die fungusmetaboliet op die worteloppervlak te drup met 'n pasteurpipet. Die gekonsentreerde metabolietoplossing is verdun tot die verhouding van 1:50. Die geringe verdunning van die metabolietoplossing stem ooreen met die wat gebruik is in 'n ondersoek na die invloed van Bipolaris maydis-

toksien op die mitochondrions van mieliewortels (Aldrich et al., 1977). Die metaboliet is eers deur 'n 0,22 $\mu$ m mikro-filter (Micropore) gefiltreer om moontlike kontaminante te verwyder. Die metabolietoplossing is vir 4 uur op die wortel gelaat voor die wortelmateriaal gemonster en vir transmissie-elektronmikroskopie voorberei is (kyk 3.9). As kontrole is materiaal gebruik wat nie aan die fungusmetaboliet blootgestel is nie.

## HOOFSTUK VIER

### RESULTATE EN BESPREKING

#### 4.1 Uitwendige kenmerke en simptome van geïnfekteerde mielieplante

##### 4.1.1 Mieliesaaillinge in vermikuliet-groeimedium

Vanaf die ontkieming van die mieliesade, die verskyning van die saailing en tot sewe dae na aanplanting, was daar geen verskil in die uitwendige voorkoms van die proef- en kontrolemateriaal nie. Belemmerde groei van die proefplante was elf dae na aanplanting merkbaar (fig. 4.1.1). Die proefplante was korter en het dunner stingels as die kontroleplante gehad. Veertien, 18 en meer dae na aanplanting was die gemiddelde hoogte van proefplante nooit meer as 50% van die van kontroleplante nie (fig. 4.1.2 en fig. 4.1.3). Die blare het na 14 dae tekens van vergeling en vogspanning begin toon. Na 21 dae het van die blaarpunte begin afsterf. Na 28 dae, wat die verloop van die eksperiment was, het egter geen saailingsterftes voorgekom nie.

Hierdie gegewens verskil met die van Shepherd et al. (1967) wat bevind het dat ten spyte van die bykans totale verkleuring van die wortelstelsels en die disintegrasie van die korteksweefsel, geen stremming in die groei van die mielieplante voorgekom het nie.

Direk na die verskyning van die koleoptiel bo die oppervlak van die groeimedium, vier dae na aanplanting, het van die gemonsterde jong primêre wortels geringe gelokaliseerde ligbruin areas getoon. Daar was geen ooglopende verskil in voorkoms van die wortels tussen die proef- en kontroleplante nie. Na sewe dae het die proefplante duidelik waarneembare klein, waterige bruin gelokaliseerde letsels op die wortels getoon. Die letsels was in

**FIGUUR 4.1 Voorkoms en simptome van geïnfekteerde plante**

Simbole: K-kontrole, P-proef

Fig. 4.1.1 Proef- en kontroleplante 11 dae na plant.

Fig. 4.1.2 Proef- en kontroleplante 14 dae na plant.

Fig. 4.1.3 Proef- en kontroleplante 18 dae na planting.

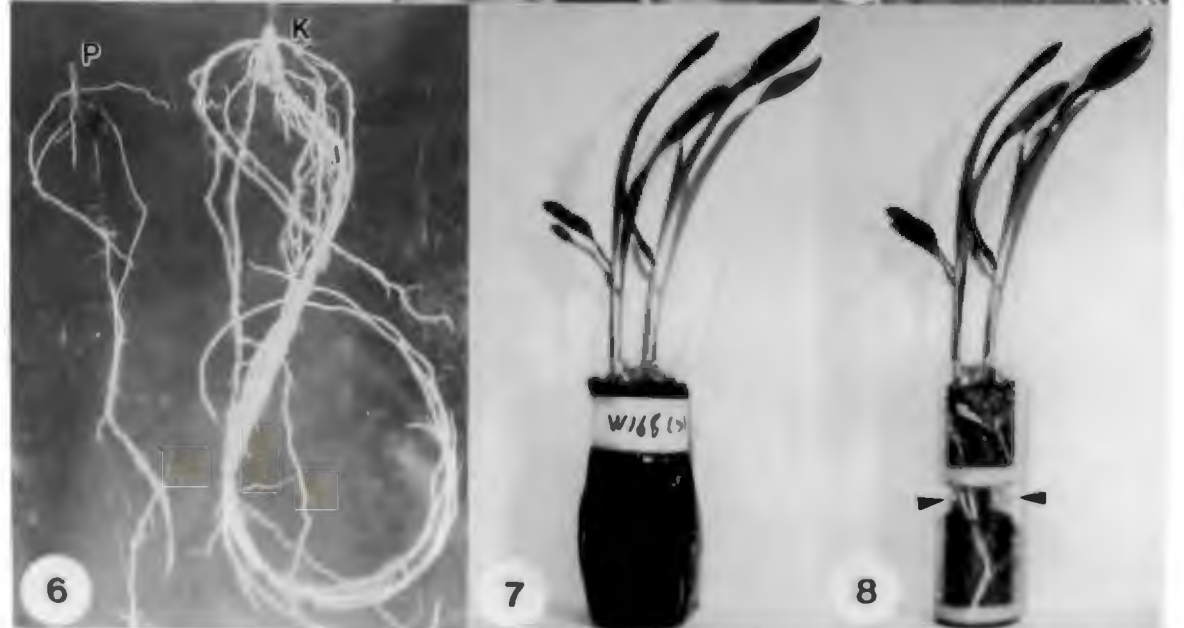
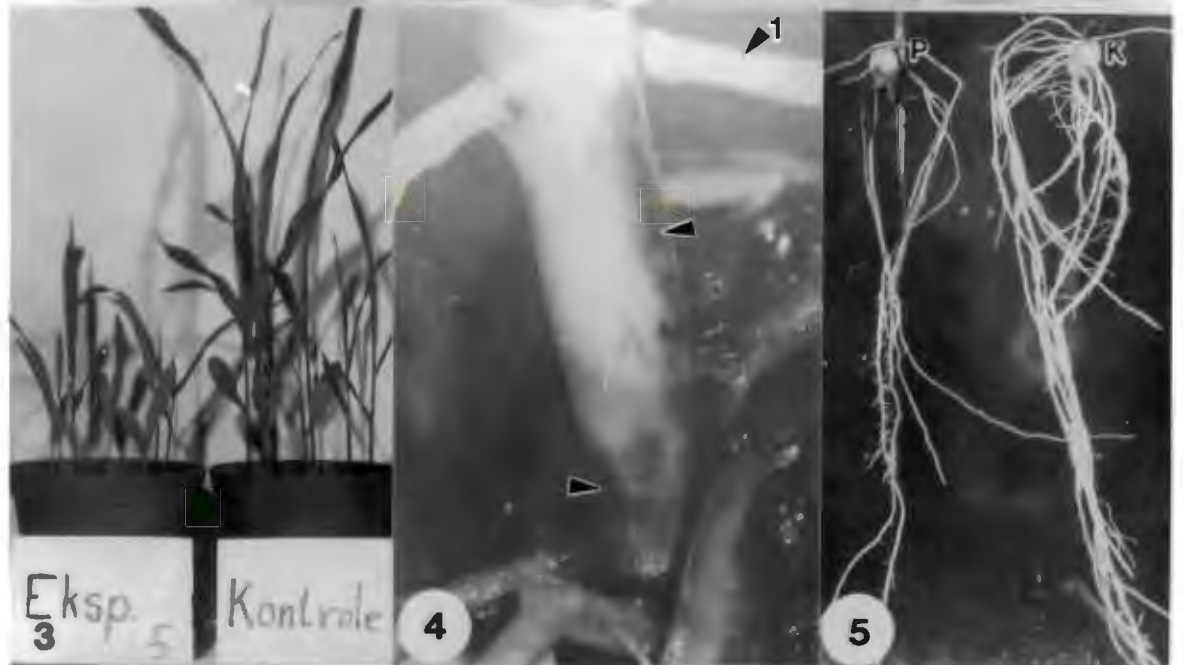
Fig. 4.1.4 Letsels op die bywortels van proefplante 14 dae na planting. Ontwikkeling van sekondêre sywortels (pyl 1) vind aan bokant van die letsel (pylle) plaas.

Fig. 4.1.5 Die goed ontwikkelde wortelstelsel (kontrole) en die swak ontwikkelde geïnfekteerde wortelstelsel 14 dae na planting. (Vermikuliet-groeimedium.)

Fig. 4.1.6 Die wortelstelsels van proef- en kontroleplante 18 dae na planting. (Vermikuliet-groeimedium.)

Fig. 4.1.7 Proefplante in die volledige WI-toestel 21 dae na planting en 14 dae na inokulering.

Fig. 4.1.8 Dieselfde WI-toestel (fig. 4.1.7) om die groei van wortels deur die lugruimte aan te toon. Die wortels is deur openinge in die buiswand (pylle) geïnokuleer.



'n vroeë stadium effens elipties met die lang as van die letsel lengteverlopend. Na sewe dae was daar, behalwe vir die aanwesigheid van die letsels, geen waarneembare verskille in die voorkoms van die proef- en kontroleplante nie.

Elf en 14 dae na aanplanting het die wortels van proefplante omvattende swart letsels en minder, korter en dunner bywortels as die kontroleplante gehad. Die ontwikkeling van sekondêre sywortels op die bywortels was beperk. Die vorming van die sekondêre sywortels het hoofsaaklik bokant die letsels plaasgevind (fig. 4.1.4). Die ingesonke letsels by die ouer gedeeltes van die bywortels het die wortels heeltemal omsluit. Die wortelomtrek was waarneembaar minder waar letsels voorgekom het. Tydens dié monsteringstadiums is daar 'n mate van kolonisasie van die oorspronklike mieliesaadreste waargeneem (Fig. 4.1.5). Die letselvorming stem ooreen met dié soos deur Shepherd et al. (1967) beskryf.

Vanaf 18 tot 28 dae het van die plante enkele nuwe bywortels gevorm wat deur die patogeen gekoloniseer is. Die proefplante het in vergelyking met die kontroles onderontwikkelde wortelstelsels gehad. Min tot geen sywortels het op die bywortels ontwikkel nie. (Fig. 4.1.6).

Uiterlik het die mielieplante wat tydens die herhaling van die eksperiment ondersoek is, geen waarneembare verskille met die eerste proef getoon nie. Daar was geen verskille in die reaksie van die twee mielielyne, A471W (AxB)A' en Ax305W (AxB), op die infeksie nie.

#### 4.1.2 Mieliesaaillinge in die WI-toestel

Die uitwendige simptome van die siekte in die deel van die onder-

soek het verskil van dit wat reeds in 4.1.1 beskryf is, aangesien die saailinge reeds gevestig was toe die inokulering van enkele van die wortels gedoen is. Die infeksie van die wortels het nie 'n nadelige effek op die bogrondse dele (fig. 4.1.7) en die ontwikkeling van die wortelstelsel tot gevolg gehad nie (fig. 4.1.8). Die letselontwikkeling het ooreengestem met dit wat reeds beskryf is (4.1.1). Binne 24 uur na inokulasie het indringing reeds plaasgevind. Twee dae na die inokulasie het gelokaliseerde ligbruin letsels ontwikkel wat na sewe dae in donkerbruin waterige letsels verander het. Die wortelweefsel direk bo en onder die vernoude letsel het normaal voorgekom.

#### 4.2 Voorpenetrasie-aspekte van die ultrastrukturele patogeen-gasheer-verhouding

##### 4.2.1 Ontkieming

Die ontkieming van die konidiums, soos gemonitor met die WI-toestel, het 12 tot 24 uur na inokulering begin. By wortels wat uit die vermikuliet-groeimediums verkry is, is die meeste ontkiemende konidiums direk op of naby die worteloppervlak waargeneem. Kiembuise het ontwikkel uit die basale sel en normaalweg direk langs die hilum van die konidium (fig. 4.2.1). Geen bipolêre ontkieming is waargeneem nie. Hierna groei die hifes in enige rigting oor die wortel- of mesokotieloppervlak (fig. 4.2.2).

Du Toit (1969) meen dat die ontkieming van die kondiums van E. pedicellatum deur die aanwesigheid van die mieliewortels gestimuleer word. Worteluitskeidings afkomstig van die gasheerplant het moontlik 'n positiewe chemotropiese reaksie op die kiembuis en ektotrofiëse hifes tot gevolg. Dit kan die rigting van hifegroei en die lokaliteit van appressoriumvorming beïnvloed. (Wynn en Staples, 1981). Die meeste hifes is in die wortel-

**FIGUUR 4.2** Lig- (LM) en skandeerelektronmikrograwe (SEM) om appressoriumvorming te toon

Simbole: ap-appressorium, eh-interzellulêre of ekstrazellulêre hife, k-konidium, kf-konidiofoor

**Fig. 4.2.1** Worteloppervlak sewe dae na inokulering. Die ontkiemde konidium gee aan 'n kiembuis oorsprong wat vertak om 'n enkelvoudige appressorium (ap) te vorm. Let op die vernouing (pyl) tussen die appressorium en die lengteverlopende interzellulêre hife (eh). (LM) Balkie 20 $\mu$ m.

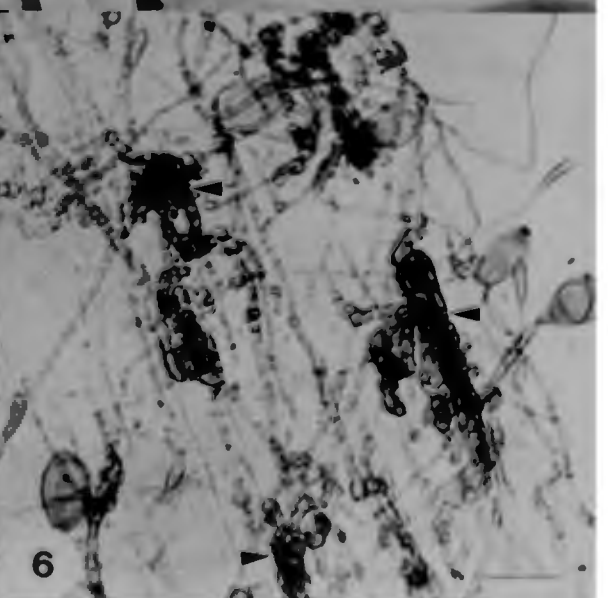
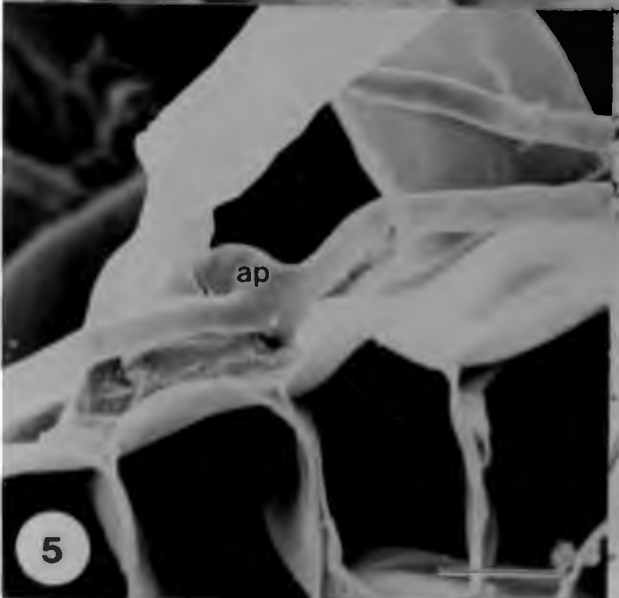
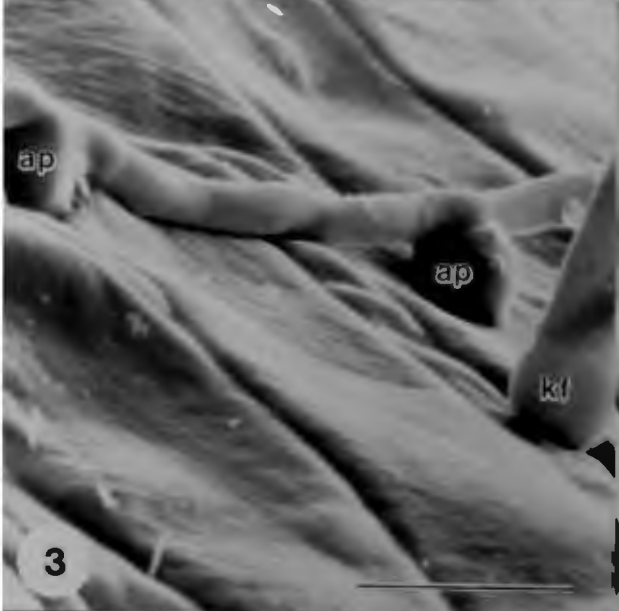
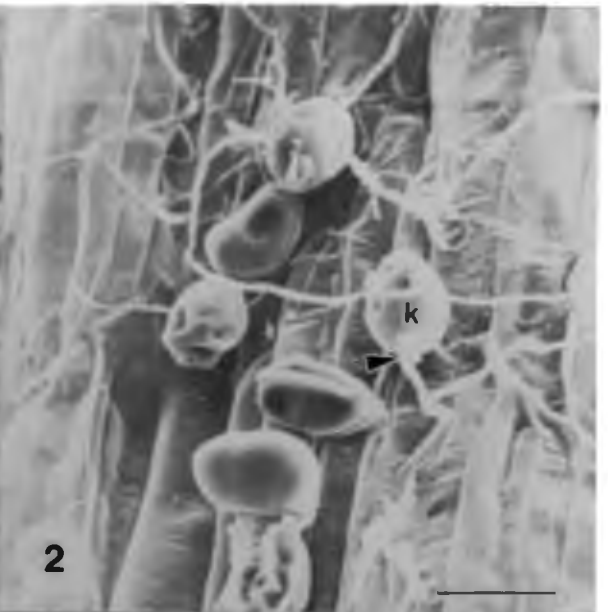
**Fig. 4.2.2** Ontkiemde konidiums (k) van Exserohilum pedicellatum op die worteloppervlak vier dae na inokulering. Die kiembuis het by die hilum (pyl) van die konidiums ontstaan. (SEM) Balkie 40 $\mu$ m.

**Fig. 4.2.3** Hife met enkelvoudige interkalêre appressoriums (ap) op die epidermissel-oppervlak en by die interzellulêre kontakzone 28 dae na planting. Let op die konidiofoor (kf) wat interzellulêr uit die onderliggende weefsel ontwikkel. (SEM) Balkie 10 $\mu$ m.

**Fig. 4.2.4** 'n Veelvoudige appressorium op die wortelepidermis wat uit 'n enkelvoudige terminale appressorium (ap) ontstaan het. Die appressorium en die sekondêre appressorium vorm bokant die interzellulêre wand (pylle). (SEM) Balkie 10 $\mu$ m.

**Fig. 4.2.5** Interkalêre appressorium (ap) op basis van wortelhaar. (Elf dae na planting.) (SEM) Balkie 10 $\mu$ m.

**Fig. 4.2.6** Worteloppervlak sewe dae na inokulering (WI toestel), met sklerotiumagtige infeksiekussings (pylle). (LM) Balkie 50 $\mu$ m.



haarstreek van die mieliewortel, waar die meeste eksudate volgens Rovira (1969) voorkom, waargeneem en appressoriumvorming vind ook by die intersellulêre gedeeltes op die wortelepidermis plaas (fig. 4.2.3 en fig. 4.2.4) waar daar volgens Bowen en Rovira (1976) 'n moontlike toename in die hoeveelheid eksudate kan wees. Die worteluitskeidings van die gasheerplant is waarskynlik ook verantwoordelik vir die bevordering van die uitwendige groei van die fungus. Stresfaktore waaraan die gasheerplant onderwerp word, kan 'n toename in worteluitskeidings veroorsaak wat die infeksieproses stimuleer (Curl, 1982).

#### 4.2.2 Appressoriumvorming

Die kiembuise van E. pedicellatum-konidiums kan direk aan 'n appressorium oorsprong gee of dit kan vir 'n tydperk oppervlakkig groei waarna verskeie appressoriums kan vorm. Die appressoriums het 'n geswede voorkoms met 'n deursnee groter as die van die vegetatiewe hifes (fig. 4.2.1, 4.2.3, 4.2.5). Appressoriumvorming is vanaf 24 uur na inokulering waargeneem. Die appressoriums kan enkelvoudig terminaal ontwikkel (fig. 4.2.1) of interkalêr opeenvolgend na mekaar op dieselfde hife voorkom (fig. 4.2.3 en fig. 4.2.5). 'n Enkele appressorium kan aan meer as een appressorium oorsprong gee (fig. 4.2.4).

Daar word soms komplekse saamgestelde appressoriums deur die fungus op die oppervlak van die mieliewortels gevorm. Dit lei tot die vorming van dikwandige, donker gepigmenteerde, sklerotiumagtige infeksiekussings (fig. 4.2.6) wat aan verskeie infeksiehifes oorsprong kan gee. Emmett en Parbery (1975) meld dat infeksiekussings wat by patogene fungusse voorkom, gevorm word in reaksie op voldoende voedingstowwe op die worteloppervlak. Die sklerotiumagtige infeksiekussings wat meervoudige saamgestelde appressoriums is, is volgens die outeurs in staat om ongunstige

toestande te oorleef. Dit is dus moontlik dat hierdie infeksiekussings dan later vir sekondêre infeksie van die mieliewortels verantwoordelik kan wees.

Appressoriumvorming is waargeneem by die basis (fig. 4.2.5) en interkalêre gedeeltes van wortelhare (fig. 4.3.1 en fig. 4.3.2), die oppervlak van epidermisselle en veral by die intersellulêre gedeelte tussen aangrensende epidermisselle (fig. 4.2.3 en fig. 4.2.4) soos ook waargeneem deur Sonderhausen en Boothroyd (1965). Die appressorium gee oorsprong aan 'n infeksiehife (fig. 4.4.2).

Alhoewel verskeie kere probeer is om die wortelpunt te infekteer, het dit nie geslaag nie en is dit duidelik dat die patogeen nie die wortelpunt as 'n infeksielokus gebruik nie. Hifegroei op die wortelgroeiopunt was beperk en indien dit voorgekom het, is appressoriums nooit op die wortelmussie, die meristematische streek en die selverlengingstreek waargeneem nie (fig. 4.3.3 en fig. 4.3.4). Die rede hiervoor is nie bekend nie. Dit mag wees dat daar eksudaatverskille in die verskillende wortelstreke voorkom (Rovira, 1969) en dat die wortelhaarstreek, en nie die wortelpunt, 'n geskikte streek vir appressoriumvorming en infeksie is. Indien chemotropiese stimulasie of ander herkenningsfaktore by die infeksieproses betrokke is (Wynn & Staples, 1981), kom dit waarskynlik nie in die wortelverlengingstreek voor nie.

Appressoriumvorming is ook nie net tot die gasheeroppervlak beperk nie. Appressoriums is ook waargeneem waar die patogeen in die gasheerweefsel 'n sel vanaf 'n intersellulêre ruimte binnedring of as die hife van een sel na 'n aangrensende sel gegroei het (fig. 4.5.4 en fig. 4.5.5).

### 4.3 Penetrasiefase

FIGUUR 4.3 Skandeerelektronmikrograwe (SEM) van E. pedicellatum op mieliewortels

Simbole: ap-appressorium

Fig. 4.3.1 'n Hife met omsirkelende appressorium (ap) op wortelhaar (sewe dae na planting). Let op die vernouing (pyl) van die wortelhaar waar die appressorium voorkom. Balkie  $10\mu\text{m}$ .

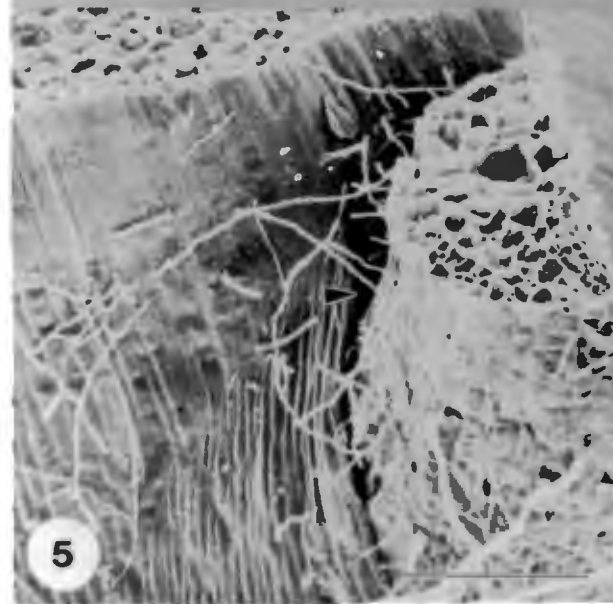
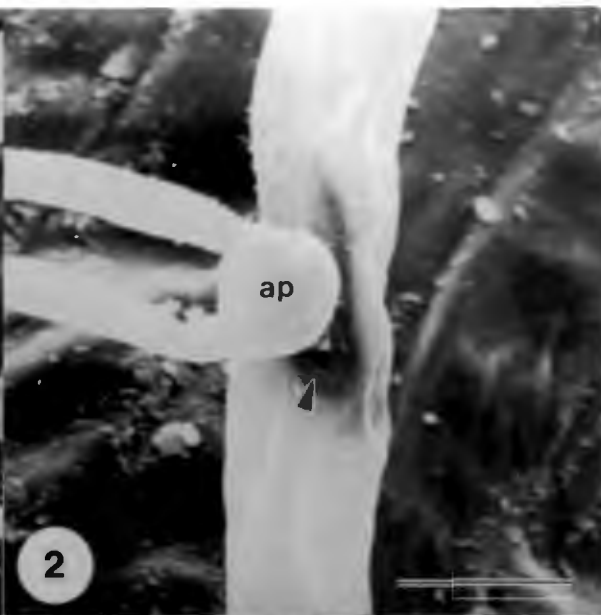
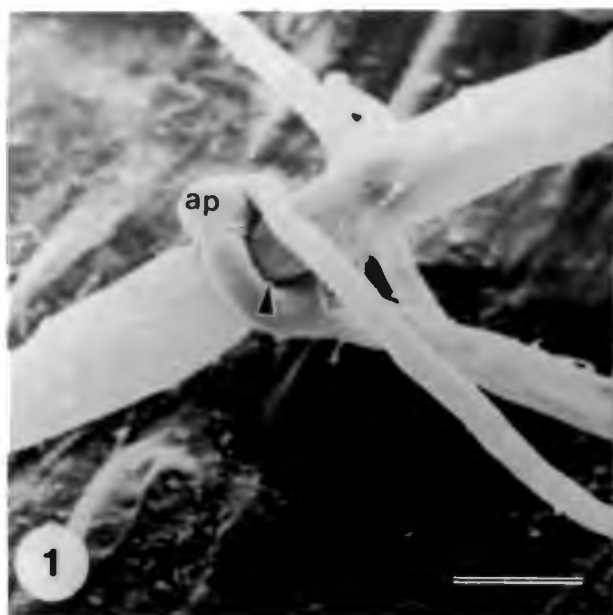
Fig. 4.3.2 'n Interkalêre appressorium (ap) op 'n wortelhaar. Let op die sekondêre beeldvorming (pyl) op die wortelhaarselwand by die infeksielokus. Balkie  $10\mu\text{m}$ .

Fig. 4.3.3 Wortelpunt van proefmateriaal 7 dae na planting sonder enige hifes op oppervlak. Balkie  $40\mu\text{m}$ .

Fig. 4.3.4 Fungushife (pyl) by die pasgevormde sywortel wat uit 'n bywortel ontstaan het. Geen appressoriums is aanwesig nie en dit is waarskynlik net uitwendige oppervlakhifes. (28 dae na planting) Balkie  $40\mu\text{m}$ .

Fig. 4.3.5 Opening (pyl) tussen sywortel en bywortel wat passiewe indringing moontlik maak. (17 dae na planting) Balkie  $200\mu\text{m}$ .

Fig. 4.3.6 Hoër vergroting van fig. 4.3.5 om indringing van hifes (pyl) deur die opening tussen sy- en bywortels, te toon. Balkie  $10\mu\text{m}$ .



Na appressoriumvorming by verskillende lokusse op die gasheer dring die fungus die intra- en intersellulêre ruimtes binne. Daar is geen verskil in die penetrasie van epidermis- en korteksselwande nie, soos ook deur Sonderhousen en Boothroyd (1965) bevind is. Hifes van die patogeen is 96 uur na inokulasie in die wortelkorteksselle waargeneem.

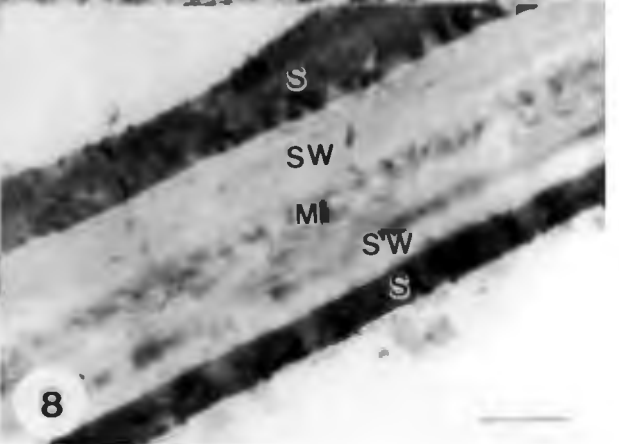
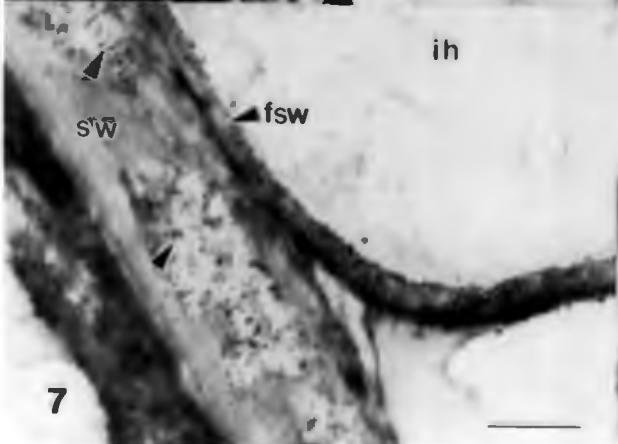
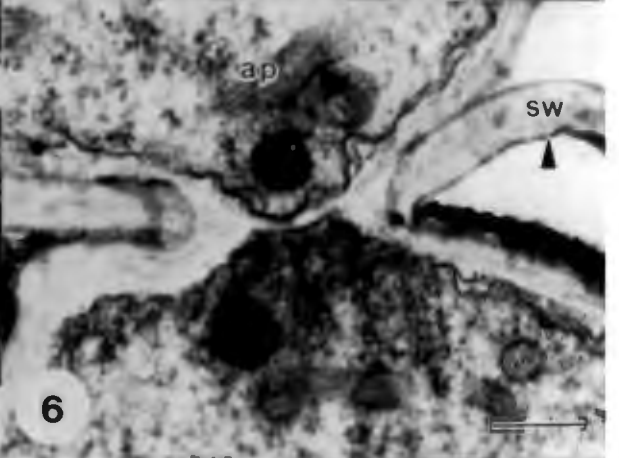
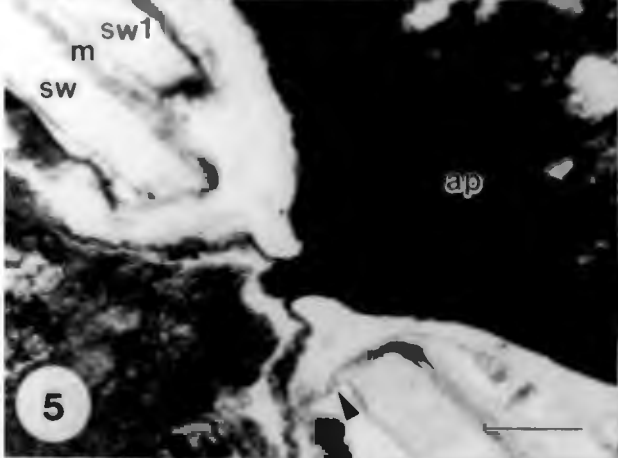
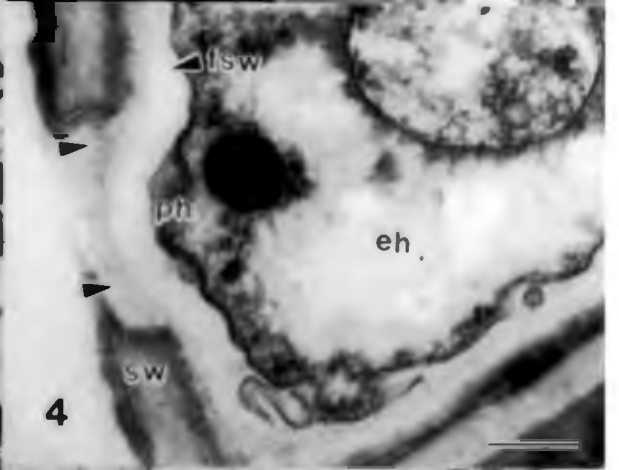
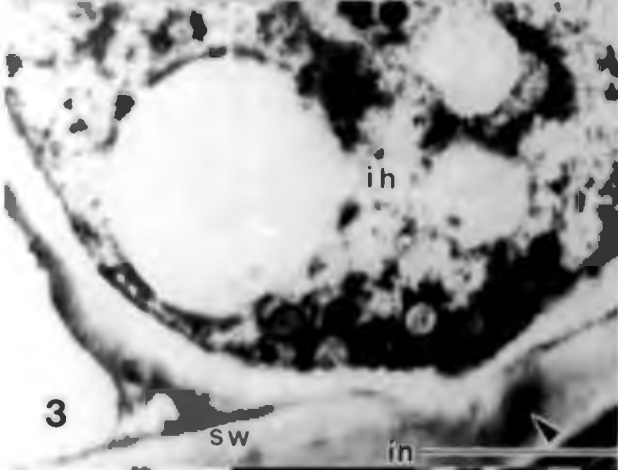
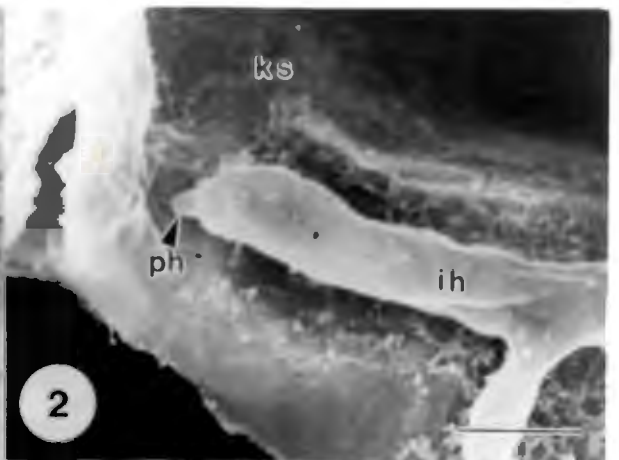
Infeksiehifes vorm uit die appressorium by die kontakgebied tussen die fungushife en die gasheerselwand (fig. 4.4.1 en fig. 4.4.2). Die deursnee van die infeksiehife is ongeveer  $0,5\mu\text{m}$  en is kleiner as die deursnee van die normale hifes ( $2,5 - 4,0\mu\text{m}$ ) en van die appressoriums ( $4,0 - 5,5\mu\text{m}$ ). Die selwand van die infeksiehife wat met die gasheerselwand kontak maak, is dunner ( $0,08 - 0,1\mu\text{m}$ ) as normale hifeselwande ( $\pm 0,2\mu\text{m}$ ) (fig. 4.4.3). Direk na die indringing deur die selwand het die hife weer opgeswel vertoon en het die hife na verdere groei weer normale dimensies, ongeag of dit inter- of intrasellulêr voorkom (fig. 4.4.1). Die waarneming stem ooreen met die bevindings van Sonderhousen en Boothroyd (1965).

Die gasheerselwande direk onder en aangrensend aan die infeksiehife vertoon amorgelektroondeurlatende sones wat deur 'n elektroondigte laagie omgrens word. Die gedeeltes verskil van die gedeeltes van die gasheerselwand verder weg van die infeksiehife (fig. 4.4.3 en fig. 4.4.4). Die rand van die opening in die selwand waardeur die infeksiehife groei, is oneweredig. Indien die penetrasie van een sel direk na 'n aanliggende sel plaasvind, kan die twee aangrensende selle se selwande en die middellamella in 'n verskillende mate afgebreek word. (Fig. 4.4.5). Hierdie veranderinge wat in die selwand plaasvind, dui op ensiematiese afbraak van selwandmateriaal en stem ooreen met die vereistes wat vir ensiematiese afbraak van selwande gestel word (Aist, 1976; Bishop

FIGUUR 4.4 Lig- (LM), transmissie- (TEM) en skandeerelektronmikrograwe (SEM) om die penetrasiefase deur E. pedicellatum te toon

Simbole: ap-appressorium, eh-interzellulêre hife of ekstrazellulêre hife, fsw-fungusselwand, ih-intrazellulêre hife, in-interzellulêre neerlegging, ks-kortekssel, m-middellamella, ph-penetrasihife, s-sitoplasma, sw-gasheerselwand.

- Fig. 4.4.1 LM van worteloppervlak sewe dae na inokulering (WIT-toestel). Die enkelvoudige appressorium (ap) het die sel met 'n vernoude penetrasihife (pyl) binnegedring. Balkie 20 $\mu$ m.
- Fig. 4.4.2 SEM van intrazellulêre hife (ih) in kortekssel (ks) waarvan die sitoplasma verwyder is om die penetrasihife (ph) voor penetrasie te toon. Balkie 4 $\mu$ m.
- Fig. 4.4.3 Intrazellulêre fungushife (ih) besig om 'n gasheerselwand (sw) en interzellulêre neerleggings (in) ensiematies (pyl) af te breek. (TEM) Balkie 1,0 $\mu$ m.
- Fig. 4.4.4 Interzellulêre hife (eh) in aanvangstadium van indringing in die gasheersel. Let op die gewysigde elektrondeurlatende deel (pyl) van die selwand direk teen die penetrasihife (ph) in vergelyking met die gedeeltes van die selwand (sw) wat verder van die infasihife geleë is. (TEM) Balkie 0,25 $\mu$ m.
- Fig. 4.4.5 Penetrasie tussen aangrensende wortelkorteksselle. Die selwand (sw1) naaste aan die intrazellulêre appressorium (ap) is meer verteer as die selwand (sw) en die middellamella (m) naaste aan die nopenetrasie-gedeelte van die hife. Let op die omgebuigde selwanddeel (pyl). (TEM) Balkie 0,25 $\mu$ m.
- Fig. 4.4.6 Omgebuigde korteksselwand (pyl) as gevolg van fisiese druk van die ekstrazellulêre appressorium (ap) tydens verwyding van die penetrasihife. (TEM) Balkie 0,25 $\mu$ m.
- Fig. 4.4.7 Koperoksiedpresipitaattoets vir die aanwesigheid van sellulase soos deur die patoogeen geproduseer. In die korteksselwand (sw) teenaan die fungushife (ih) kom elektrondeurlatende areas met elektrondigte koperoksieddeeltjies (pyl) voor. (TEM) Balkie 0,25 $\mu$ m.
- Fig. 4.4.8 Koperoksiedpresipitaattoets van 'n selwand (sw) van ongeïnfekteerde selle toon geen elektrondigte koperoksieddeeltjies. (TEM) Balkie 0,25 $\mu$ m.



en Cooper, 1983).

Met behulp van 'n koperoksiedpresipitaat-toets waartydens Benedict-oplossing gebruik word (Bal, 1974) (kyk 3.12) is vasgestel dat sellulase deel is van die ensiemkompleks van die patogeen. Die geïnfekteerde wortelweefsel waarin die ensiem, wat deur die hifes gesekreter is, aanwesig is, word met karboksiemetielsellulose geïnkubeer. Die reaksie tussen die ensiem, indien aanwesig, en die karboksiemetielsellulose lewer reduserende suikers wat met die koperverbindings in 'n Benedicts-oplossing reageer om koperoksiedpresipitate te vorm wat elektrondig vertoon (fig. 4.4.7). Dit dui op die aanwesigheid van sellulase. Soos gesien in fig. 4.4.7 kan die presiese lokus van die ensiemwerking so aangedui word en is dit direk aangrensend aan die hifes van die patogeen. Benewens die vermoë van die patogeen om ensiematies deur selwande te dring, is dit ook in staat om ekstrasellulêre neerleggings ensiematies te degradeer (fig. 4.4.3).

Exserohilum pedicellatum maak nie net van ensiemwerking gebruik om selle te koloniseer nie. Die penetrasiehifes vergroot waarskynlik ook die openinge wat ensiematies ontstaan het meganies. Dit kan afgelei word van die omgebuigde selwanddele (fig. 4.4.5) rondom penetrasie-openinge en aan die teenwoordigheid van gebuigde selwande waarvan die selinhoud weggetrek het (fig. 4.4.6). Dit is moontlik dat uitsetting van die infeksiehife die reeds versagte, ensiematies gedegradeerde selwandgedeeltes kan wegdruk. Aist (1976) meld ook dat dit een van die verskynsels is wat dui op meganiese druk wat deur patogene uitgeoefen word.

Benewens die penetrasiestrukture waarmee die patogeen toegang tot die gasheerselle verkry, is ook waargeneem dat dit op 'n passiewe

wyse die openinge tussen die bywortel en die nuutgevormde sywortels gebruik (fig. 4.3.5 en fig. 4.3.6) om die gasheer binne te dring.

#### 4.4 Koloniseringsfase

##### 4.4.1 Verloop van kolonisering

Tydens dié fase vertoon die gekoloniseerde epidermis en buitenste korteksselle na vier dae ligbruin. Die patogeen koloniseer die kortekswefsel binne sewe dae tot teen die endodermis met hifes wat hoofsaaklik intersellulêr groei. Die toename in kolonisering gaan gepaard met die vorming van effens elliptiese, donkerbruin, ingesonke waterige letsels. In dié sentrale deel van 'n jong letsel kan intra- en intersellulêre hifes waargeneem word. By die periferie van die letsels was die kolonisering oorwegend intersellulêr met 'n geringe mate van intrasellulêre kolonisering. Dit het voorgekom asof die vordering van die patogeen deur die gasheerwefsel vinniger was indien die hifes in lengteverlopende intersellulêre ruimtes gegroei het (fig. 4.5.1 en fig. 4.5.2). Dit is ook waargeneem dat die hifes selle ook vanaf die intersellulêre ruimtes binnegedring het deur aan die buiteoppervlak van die selle te heg (fig. 4.5.1).

Die grootste deel van die weefsel in die sentrale gedeeltes van letsels is na 14 dae deur intrasellulêre hifes gekoloniseer (fig. 4.5.3). Intrasellulêre kolonisering van selle deur die intersellulêre hifes het redelik algemeen voorgekom. Koloniseringshifes het ook intrasellulêr van sel tot sel gegroei (fig. 4.5.4). Lengteverlopende intrasellulêre hifes vertak in tangensiale en radiale rigtings en dit kan die groei in die bepaalde rigtings volhou. Hifes het transsellulêr gegroei (fig. 4.5.5) of is dikwels tussen die selwand en die sitoplasma waargeneem (fig. 4.8.1).

FIGUUR 4.5 Skandeer- (SEM) en transmissie-elektronmikrograwe (TEM) om die kolonisasiefase van E. pedicellatum in mieliewortels te illustreer

Simbole: ap-appressorium, eh-intercellulêre hife of ekstracellulêre hife, es-epidermissel, ih-intracellulêre hife, ks-korteksel, s-sitoplasma, sw-gasheerselwand.

Fig. 4.5.1 Lengteverlopende intercellulêre kolonisering van korteksel deur hifes (eh) aan die periferie van die letsel (28 dae na planting). (SEM) Balkie 10 $\mu$ m.

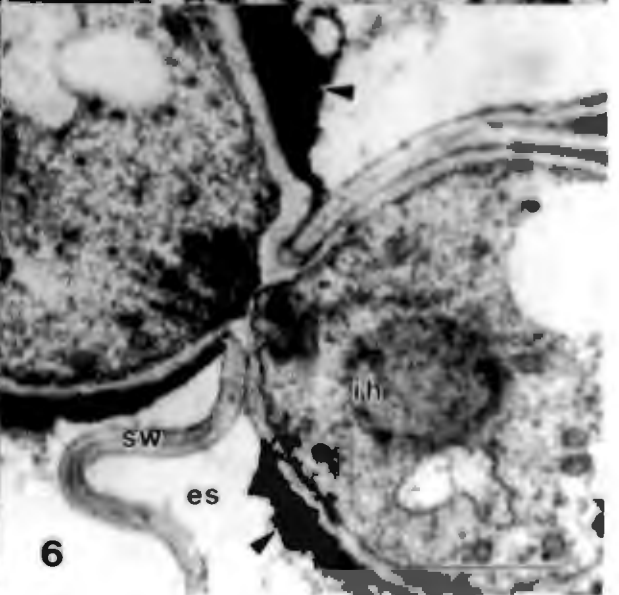
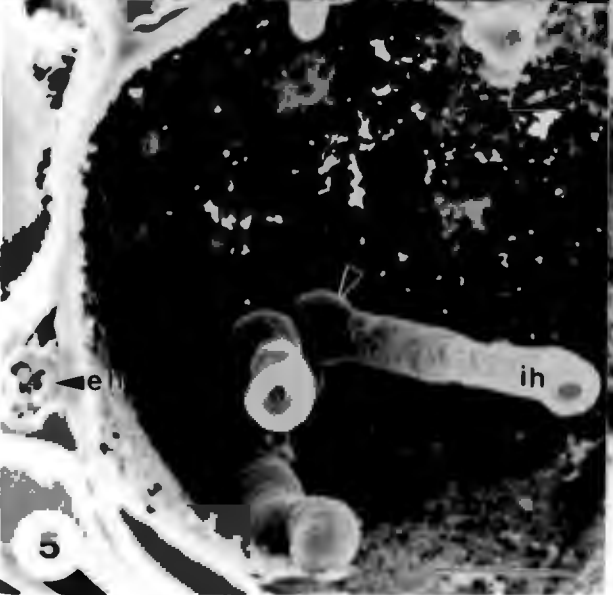
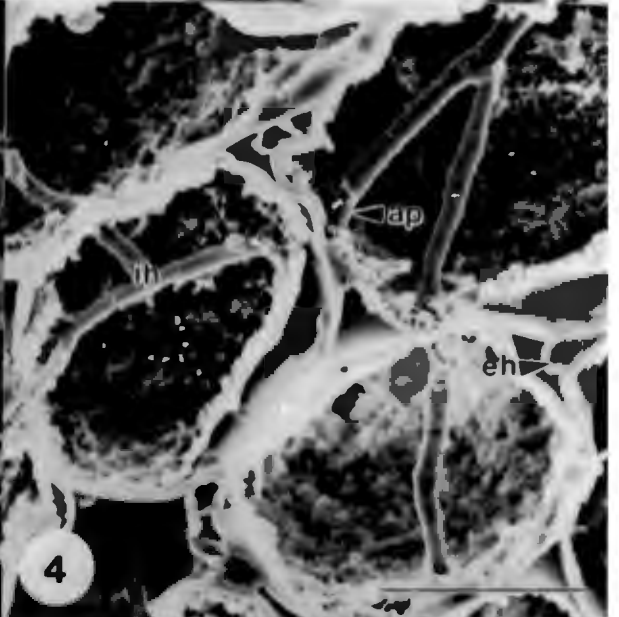
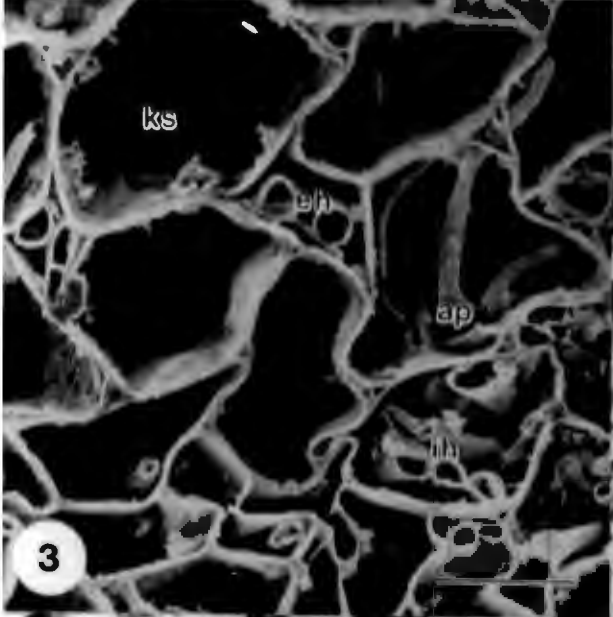
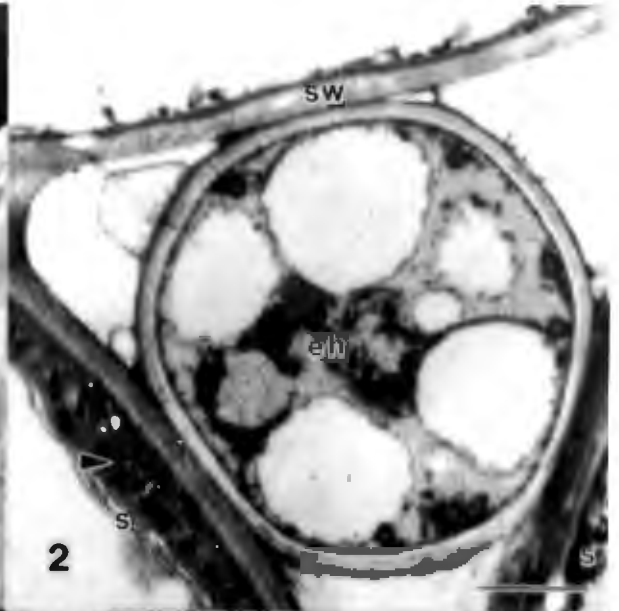
Fig. 4.5.2 'n Intercellulêre hife (eh) in kontak met drie wortelkorteksel. Let op die intracellulêre selwandneerleggings (pyl) asook die aggregasie van die gasheersitoplasma (s) in die selle. (TEM) Balkie 1,0

Fig. 4.5.3 Gekoloniseerde korteksel waarvan die sitoplasma verwyder is. Die inter- (eh) en intracellulêre hifes (ih) het die strukturele verval van die selle 14 dae na planting veroorsaak. (SEM) Balkie 20 $\mu$ m.

Fig. 4.5.4 Intracellulêre hifes (ih) wat van sel tot sel in die wortelkorteksel groei. (21 dae na planting) (SEM, Poli-etileenglikol voorbereiding) Balkie 20 $\mu$ m.

Fig. 4.5.5 Deursnee deur mieliekorteksel met intracellulêre hifes wat transcellulêr in die lengte van die sel groei. Let op die geswolle voorkoms (pyl) van die hifes voor of na penetrasie (SEM, Poli-etileenglikol voorbereiding) Balkie 10 $\mu$ m.

Fig. 4.5.6 Kolonisering van 'n wortelkorteksel vanuit 'n epidermissel (es). Geaggregeerde gasheersitoplasma (pylle) kom om die fungushifes (ih en ander) voor en daar is ook opvallende distorsie van die selwand (sw) na kolonisering. (TEM) Balkie 1,0 $\mu$ m.



Benewens direkte indringing het die kolonisering van sywortels vanuit die geïnfekteerde bywortels deur die korteksselle plaasgevind. Die patogeen het ook wortelhare gekoloniseer deur dit direk in te dring (fig. 4.2.5, fig. 4.3.1 en fig. 4.3.2) of deur dit vanaf die reeds gekoloniseerde wortelweefsel binne te dring (fig. 4.6.1 en fig. 4.6.2).

Kolonisasie van die wortelweefsel tot by die endodermis is binne sewe dae in die WI-toestel en die vermikuliet-aanplantings waargeneem. Waar infeksie gedoen is deur die plante in geïnfesteerde vermikuliet te plant, is die patogeen eers na 28 dae in die vaatweefsel (fig. 4.6.3 en fig. 4.6.4) waargeneem. Die plante in die WI-toestel is nie lank genoeg gehou om dit waar te neem nie. Die wyse waarop die hifes toegang tot die vaatweefsel gekry het, kon nie vasgestel word nie. Dit het nie deur die jong ongedifferensieerde weefsel van die wortelpunte plaasgevind nie en daar is geen penetrasie van die endodermis waargeneem nie. Die verdikte radiale, dwars en binneste tangensiale wande van die endodermiselle vorm moontlik 'n effektiewe grenslaag (fig. 4.6.5 en fig. 4.6.6). Sonderhausen en Boothroyd (1965) meld ook dat die patogeen eers in die vaatweefsel aanwesig was nadat gevorderde kolonisering van die korteksweefsel plaasgevind het. Hulle beskryf egter nie hoe die patogeen die vaatweefsel binnegedring het nie. Alhoewel daar in my proewe geen bewyse voor gevind is nie, kon intersellulêre penetrasie deur die endodermis moontlik plaasgevind het nadat die weefsels 'n hoë mate van degradasie ondergaan het. Die endodermiswande was egter nadat die korteksweefsel reeds gedegenerer was, steeds intakt. Aangesien die epidermis en korteksselle nie effektiewe weerstand teen kolonisering deur die patogeen kon bied nie, kan die endodermis volgens Bishop en Cooper (1983) as 'n beperkende streek tydens patogenese in die

FIGUUR 4.6 Skandeer- (SEM), transmissie-elektron- (TEM) en lig-  
mikrograwe (LM) om die kolonisasiefase van E. pedicel-  
latum in mieliewortels te illustreer (Vervolg)

Simbole: AP-appressorium, ED-endodermis, IH-intrasellulêre  
hife, KS-korteksel, WH-wortelhaar, XH-xileemhoutvate.

Fig. 4.6.1 Kolonisering van wortelhare deur fungushifes (pyl) uit  
onderliggende epidermisselle. (LM van dun geslypte  
Spurr-blokkies). Balkie 30 $\mu$ m.

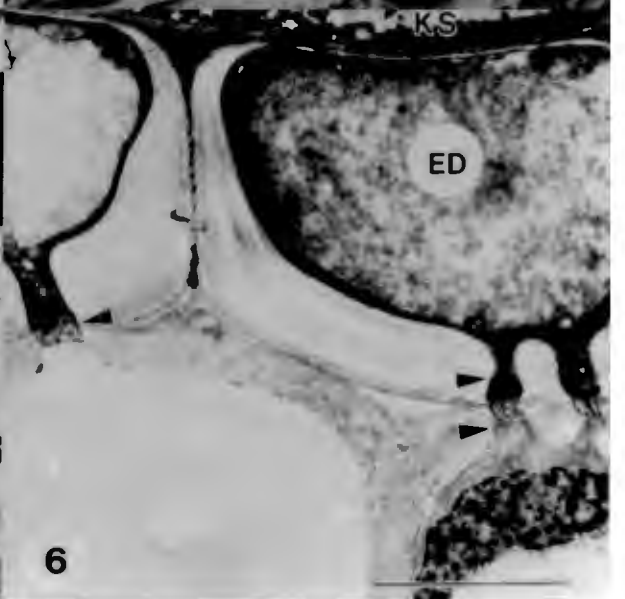
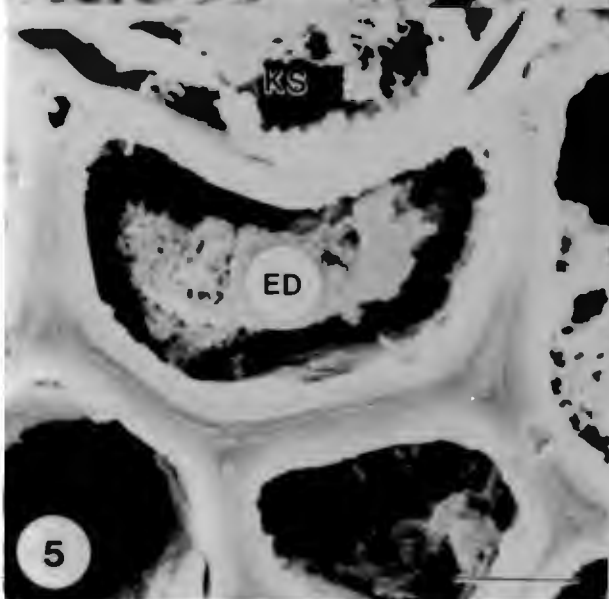
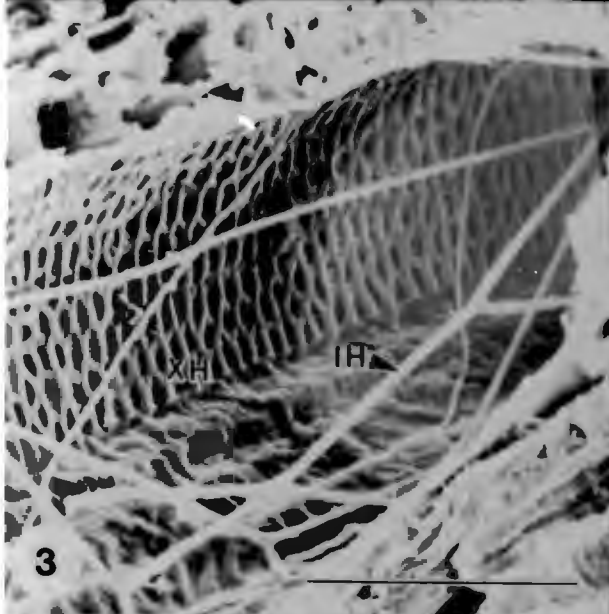
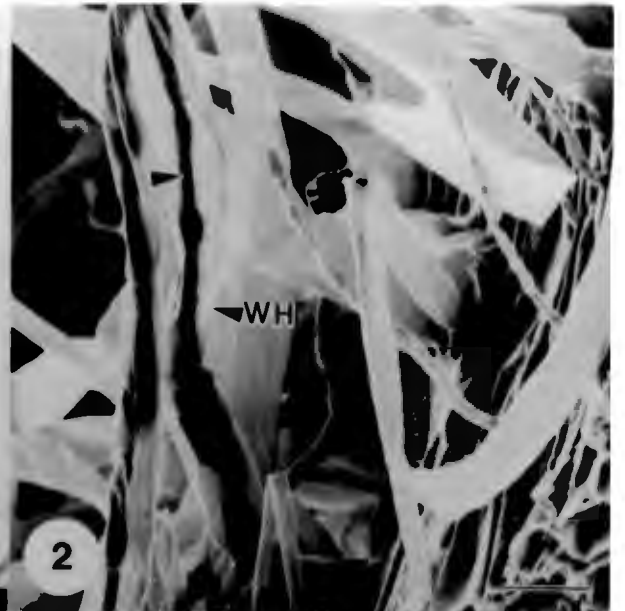
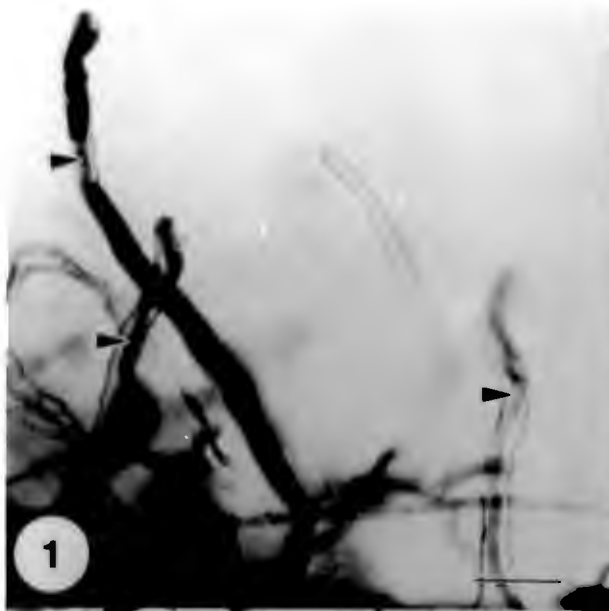
Fig. 4.6.2 SEM om wortelhaarkolonisasie (WH) deur die fungus met  
behulp van sekondêre beeldvorming aan te dui (pyl).  
Balkie 20 $\mu$ m.

Fig. 4.6.3 Kolonisering van wortelxileemvate (XH) deur  
intrasellulêre hifes (IH) 28 dae na planting in ver-  
mikulier. (SEM) Balkie 40 $\mu$ m.

Fig. 4.6.4 Aanwesigheid van patogeen (IH) in xileemvate (XH) van  
gasheer 28 dae na planting. Let op die appressorium  
(AP-pyl) op die dele van die selwand sonder sekondêre  
selwandverdikkings. (SEM) Balkie 20 $\mu$ m.

Fig. 4.6.5 Sekondêr verdikte selwande van die wortelendodermis  
(ED). (SEM, Poli-etiëenglikol voorbereiding) Balkie  
5 $\mu$ m.

Fig. 4.6.6 Wortelendodermiselle met stippels en plasmodemas  
(pyl). (21 dae na plant) (TEM) Balkie 4,0 $\mu$ m.



wortelweefsel van die gasheer beskou word, omdat dit voorkom dat die patogeenhifes vinnig die vaatweefsel koloniseer. Die outeurs het gevind dat die endodermis van weerstandbiedende tamatiewortels 'n effektiewe hindernis teen die indringing van die vaatweefsel deur Verticillium albo-atrum en Fusarium oxysporum bied.

#### 4.4.2 Die ultrastrukturele effek van die patoogeen op die gasheerselle tydens kolonisering

Verskille in die geïnfekteerde en ongeïnfekteerde wortel- en mesokotielweefsel kon by lae vergrotings waargeneem word. Die selvorme van die gekoloniseerde korteksweefsel by die wortels en mesokotiele was onreëlmatig en die strukturele verval is waarneembaar. Daar was, afhangende van die tydsverloop, variërende verlies aan anatomiese integriteit. (Fig. 4.7.1, fig. 4.7.2). Die endodermis en die onderliggende vaatweefsel het normaal vertoon en dit kom steeds funksioneel voor. In gedeeltes wat tot 'n hoë mate gekoloniseer is, het die selwande van wortelkorteksweefsel na 28 dae tot so 'n mate gedegenerereer dat die oorspronklike morfologie van die dele van die weefsel nie meer herken kon word nie (fig. 4.8.4).

Na penetrasie van 'n sel is die eerste effek van die patoogeen die aggregasie van sitoplasma. Die gasheersitoplasma versamel om die indringende hife, of ook in die gedeeltes van die gasheerselle naaste aan intersellulêre hifes (fig. 4.8.1). Die organelle in die geaggregeerde sitoplasma degenerereer opvallend (fig. 4.8.2). Endoplasmiese retikulum en golgi-apparaat kon nie in die sitoplasma van geïnfekteerde selle herken word nie.

Die aggregasie van sitoplasma is volgens Cooper (1981) een van die eerste en mees algemene reaksies van gasheerselle op die aanwesigheid van 'n patoogeen. In die geval van Verticillium albo-

FIGUUR 4.7 Skandeerelektronmikrograwe van deursnee van mieliewortels en -mesokotiele na sitoplasmaverwydering en voorbereiding met poli-etileenglikol

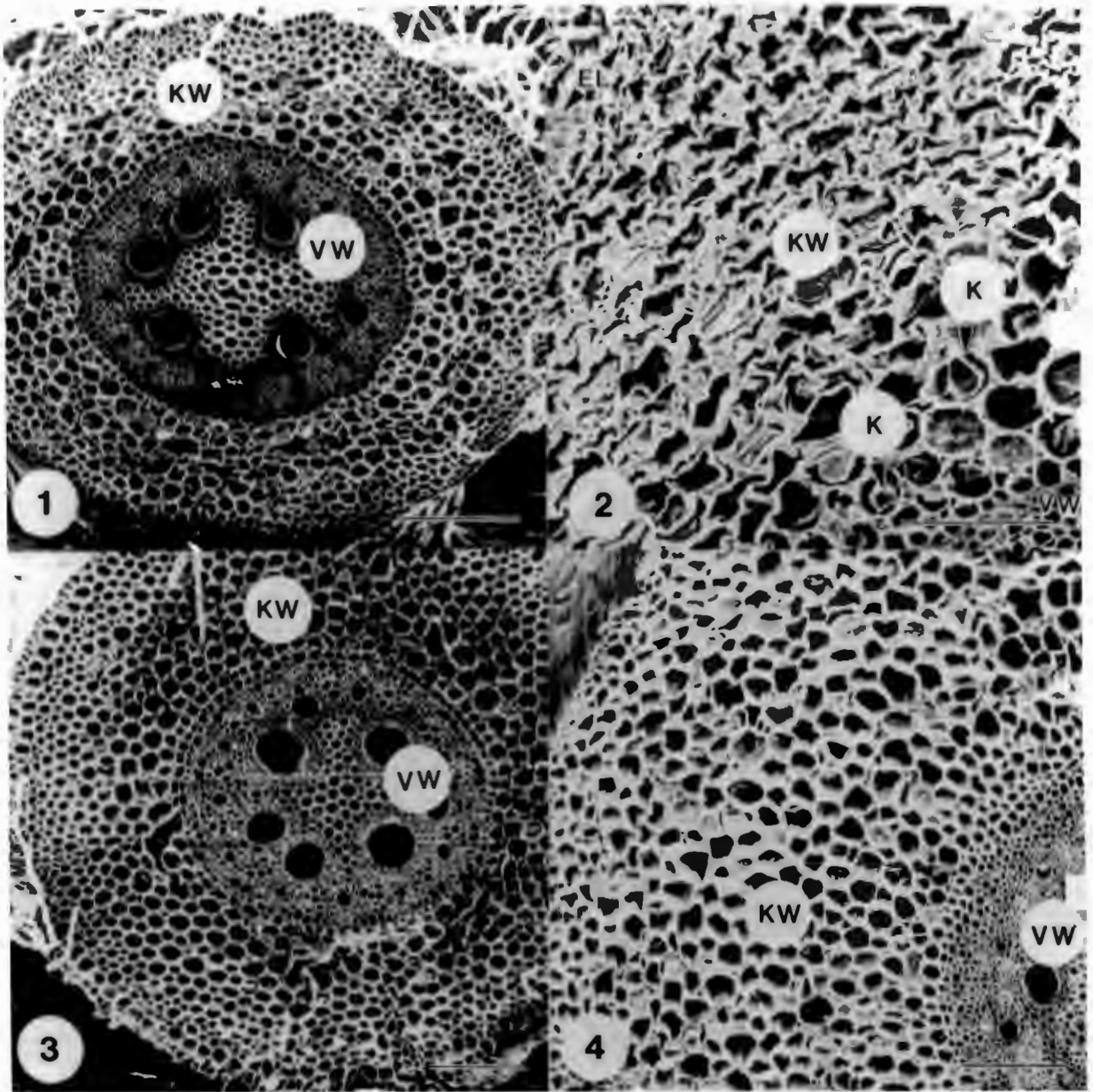
Simbole: EL-epidermislaag, K-konidium, KW-kortekswaefsel, VW-vaatwaefsel.

Fig. 4.7.1 Dwarsdeursnee van geïnfekteerde wortel 18 dae na plant. Strukturele verval (in vergelyking met fig. 4.7.3) van kortekswaefsel (KW) is waarneembaar. Die vaatwaefsel (VW) toon geen versteuring nie. Balkie 200 $\mu$ m.

Fig. 4.7.2 Dwarsdeursnee van geïnfekteerde mesokotiel 24 dae na plant. Die gekoloniseerde kortekswaefsel (KW) toon 'n hoë mate van degenerasie. Konidiumvorming (K-pyl) het reeds in die kortekswaefsel plaasgevind. Balkie 100 $\mu$ m.

Fig. 4.7.3 Dwarsdeursnee van ongeïnfekteerde wortel 21 dae na plant. Balkie 200 $\mu$ m.

Fig. 4.7.4 Dwarsdeursnee van ongeïnfekteerde mesokotiel 18 dae na plant. Balkie 200 $\mu$ m.



atrum in die korteksselle van 'n weerstandbiedende tamatie-kultivar, dien dit om onder andere die vordering van die patogeen te belemmer (Bishop en Cooper, 1983).

Die degenerasie lei ook tot die versteuring van die membraansisteam van gasheerselle. In die geïnfekteerde selle was ook geen duidelik gedefinieerde organelle waarneembaar nie (fig. 4.8.2 en fig. 4.8.3). Volgens Goodman (1972) dui dit op strukturele en funksionele veranderings wat plaasgevind het. In teenstelling met die geïnfekteerde selle is geen afwykings in die inter- en intrasellulêre hifes van die patogeen waargeneem nie (fig. 4.8.1).

Die buite-membraan van mitochondrions van geïnfekteerde selle het onderbroke vertoon. Die kristas was òf verwronge òf afwesig (fig. 4.8.2 en fig. 4.8.3). Hanchey en Wheeler (1971) meld dat infeksie deur Phytophthora parasitica var. nicotianae verwronge mitochondrions tot gevolg gehad het in selle wat langs geïnfekteerde selle was.

In sommige selle is ook neerleggings van materiaal tussen die plasmalemma en die selwand teenoor die intersellulêre hifes waargeneem (fig. 4.5.2). Hierdie neerleggings kan moontlik toegeskryf word aan die aggregasie van sitoplasma (Cooper, 1981). Intersellulêre neerleggings het na 24 tot 28 dae in gekoloniseerde nekrotiese korteksweefsel voorgekom (fig. 4.8.7 en fig. 4.8.8). Die neerleggings is nie voor die tyd in nekrotiese weefsel aanwesig nie. Die aard en oorsprong daarvan is onbekend. Die neerleggings is ook eers na 24 dae in hoogs gekoloniseerde nekrotiese weefsel waargeneem. Du Toit (1966) maak melding van 'n "gomagtige stof" in gedegenerende korteksselle van mielies. Dit is dus moontlik dat die patogeen vir die neerleggings verantwoordelik

**FIGUUR 4.8** Transmissie- (TEM) en skandeerelektronmikrograwe (SEM) om die ultrastrukturele effek van patogeen op gasheerselle aan te toon

Simbole: EH-interzellulêre hife of ekstrazellulêre hife, ER-endoplasmiese retikulum, GA-golgi-apparaat, IH-intrazellulêre hife, IN-interzellulêre neerlegging, KS-kortekssel, KW-korteksweefsel, MI-mitochondrion, MK-mitochondriale krista, MM-mitochondriummembraan, S-sitoplasma, SW-gasheerselwand.

Fig. 4.8.1 Dwarssnee deur interzellulêre hife (EH) en intrazellulêre hifes (IH) in kortekssel (KS). Let op die versameling van gasheersitoplasma (S-pyl) teenaan die indringende fungushife (IH) en in die sel aangrensend aan die hife en die geïnfekteerde sel (S1-pyl). (TEM) Balkie 2,0 $\mu$ m.

Fig. 4.8.2 Sitoplasma van 'n geïnfekteerde gasheersel (KS) wat degenerasie van mitochondrions (MI) toon. Geen duidelik gedefinieerde membrane kom voor nie. (TEM) Balkie 0,4 $\mu$ m.

Fig. 4.8.3 Mitochondrions (MI) van geïnfekteerde kortekselle watstrukturele verlies toon. Slegs membrane (pylle) is nog tot 'n mate sigbaar. (TEM) Balkie 0,25 $\mu$ m.

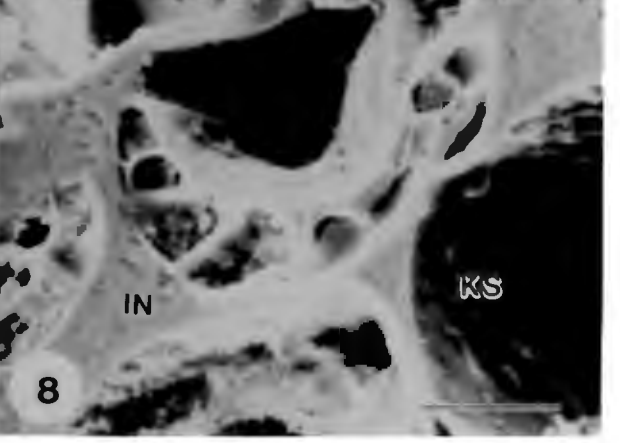
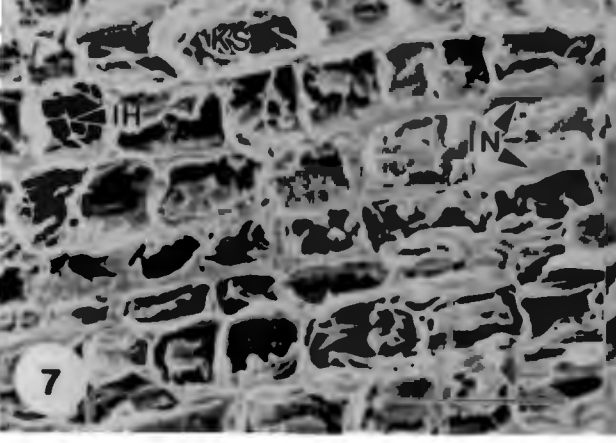
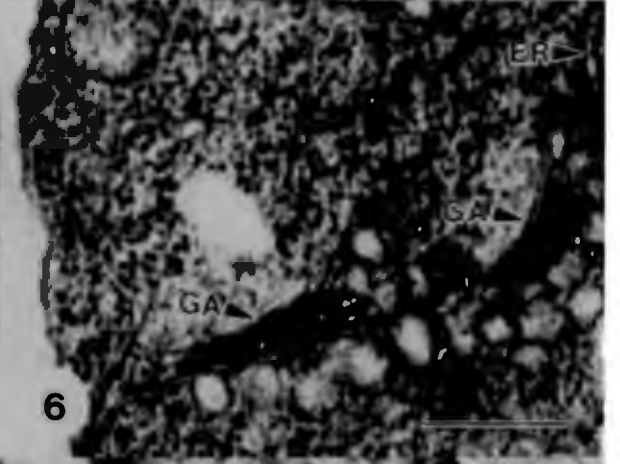
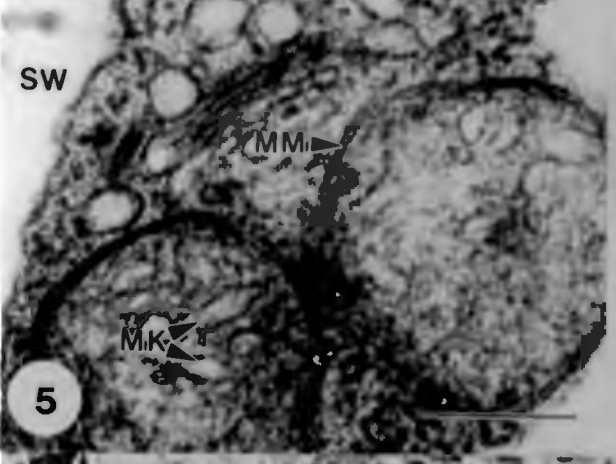
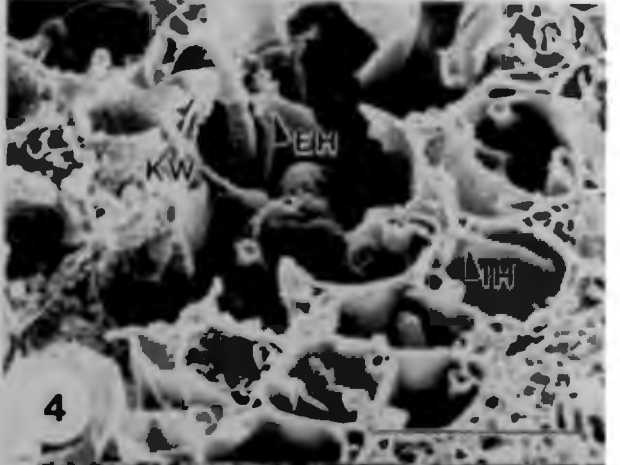
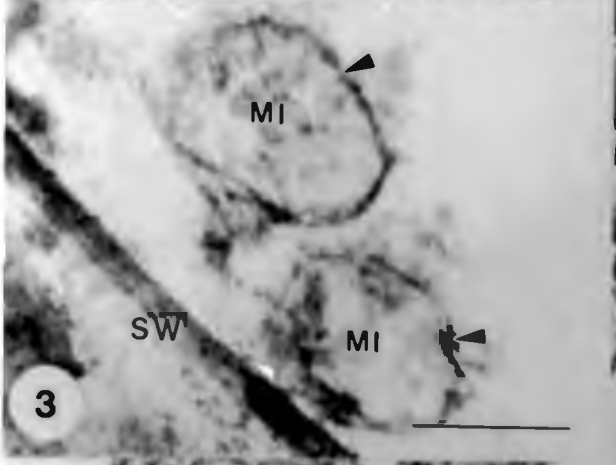
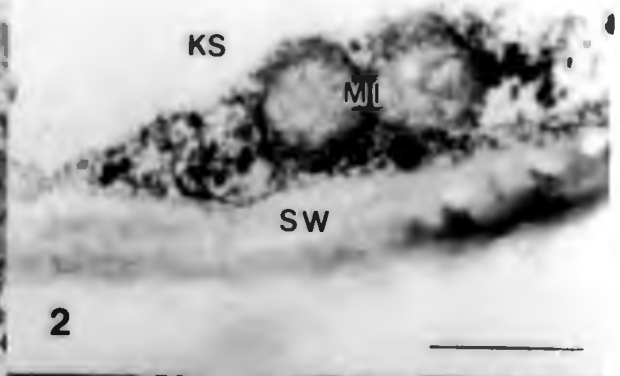
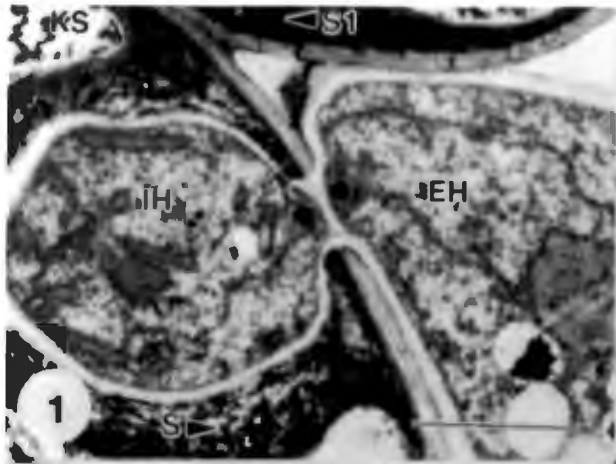
Fig. 4.8.4 Kortekselle (KW) wat 28 dae na plant 'n groot mate van kolonisering deur die patogeen toon. Gevorderde degenerasie van die selle het plaasgevind. Die fungushifes (EH en IH) toon geen degenerasie nie. (SEM) Balkie 40 $\mu$ m.

Fig. 4.8.5 Mitochondrions van ongeïnfekteerde materiaal. (TEM) Balkie 0,25 $\mu$ m.

Fig. 4.8.6 Sitoplasma met Golgi-apparaat (GA) van ongeïnfekteerde kortekselle. (TEM) Balkie 0,3 $\mu$ m.

Fig. 4.8.7 Lengtesnee van gekoloniseerde mesokotielkorteksweefsel (KS) 28 dae na plant. Neerleggings (NI) kom veral in lengteverlopende interzellulêre ruimtes voor. (SEM, Poli-etileenglikol voorbereiding na verwydering van sitoplasma) Balkie 100 $\mu$ m.

Fig. 4.8.8 Dwarssnee van kortekselle (KS) toon interzellulêre neerleggings (IN) tussen wortelkortekselle 28 dae na plant. (SEM, Poli-etileenglikol voorbereiding) Balkie 10 $\mu$ m.



is.

#### 4.5 Reprodusiefase

Die patogeen kan op verskeie maniere voortplant en oorleef. Op wortels wat uit die vermikulietmedium verkry is, is na sewe dae konidiofore met konidiums op die worteloppervlak waargeneem (fig. 4.9.1). Die konidiofore ontwikkel uit die eksterne hifes. Na 21 dae het konidiofore op die worteloppervlak verskyn (fig. 4.9.2). Die konidiofore kan direk deur die epidermisselwand of tussen twee epidermisselle na buite groei. Daar kon nie vasgestel word of die konidiums wat geproduseer is, weer ontkiem en vir verdere infeksie van wortels verantwoordelik is nie. In die WI-toestelle is 'n geringe mate van konidiogenese na 8 dae op die worteloppervlak waargeneem.

Konidiogenese is na 18 dae in die kortekswefsel van die wortel waargeneem. Die konidiumvorming het intra- (fig. 4.9.3) of intersellulêr voorgekom. In die intersellulêre ruimtes is die vorming van konidiums voorafgegaan deur 'n redelike mate van weefsel-disintegrasie (fig. 4.9.4). Sonderhousen en Boothroyd (1965) het ook gevind dat die patogeen drie weke na infeksie konidiums in die kortekswefsel produseer.

Benewens konidiums het die patogeen ook ander oppervlak-oorlewingsstrukture gevorm. Na 28 dae is 'n stroma-agtige struktuur waargeneem wat in die korteksselle van mesokotielweefsel gevorm het (fig. 4.10.1). Digte ineengestrengelde hifes wat as oorlewingsstrukture kan dien, is na 14 dae op die gasheeroppervlak waargeneem (fig. 4.10.2). Die sklerotiumagtige infeksiekussings (kyk ook fig. 4.2.6) word deur die patogeen gevorm en speel 'n rol by penetrasie. Emmett en Parbery (1975) is van mening dat hierdie soort strukture moontlik ook belangrik vir

FIGUUR 4.9 Skandeerelektronmikrograwe (SEM) van die reproduksiefase van E. pedicellatum bo-op en binne die gasheerweefsel

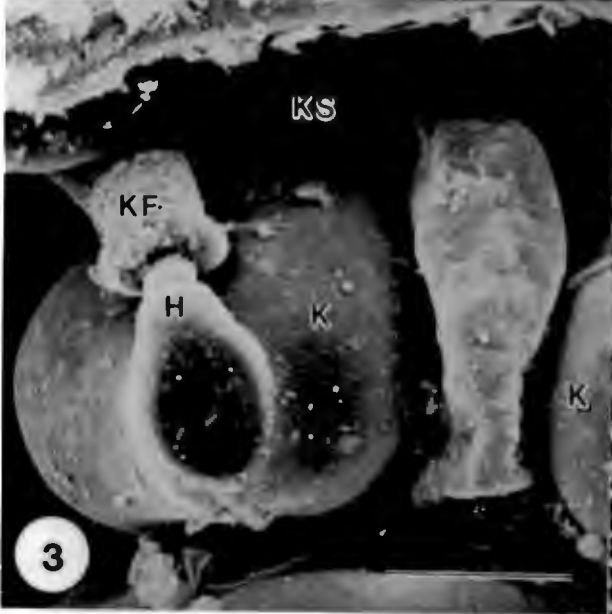
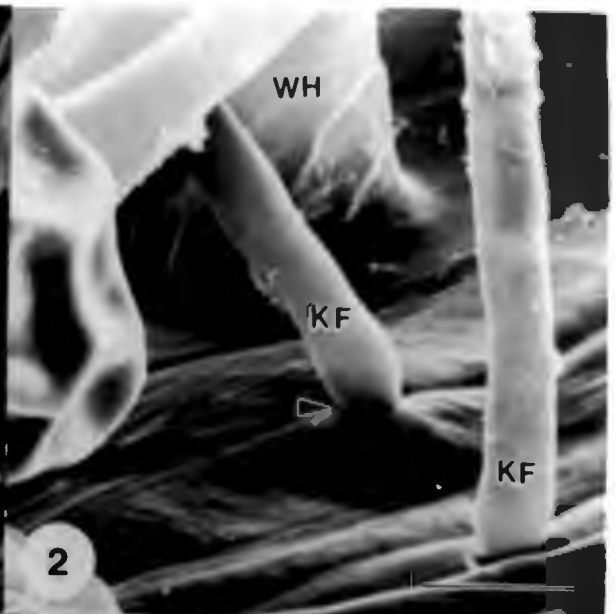
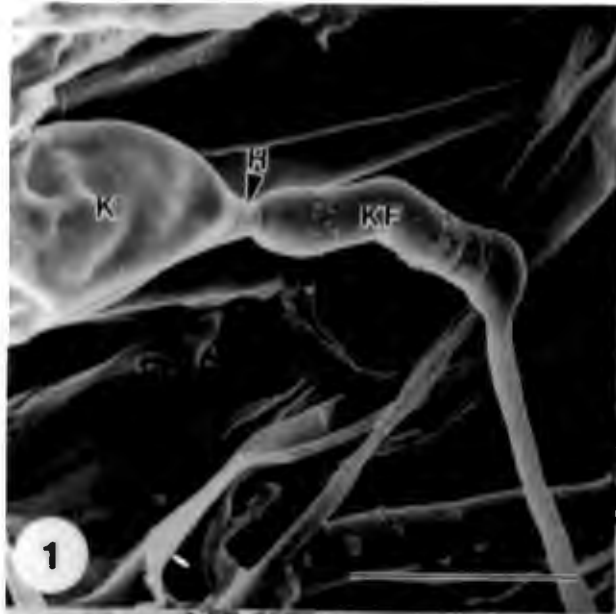
Simbole: EH-interzellulêre hife of ekstrazellulêre hife, H-hilum, IN-interzellulêre neerlegging, K-konidium, KF-konidiofoor, KS-kortekssel, WH-wortelhaar.

Fig. 4.9.1 Konidiumvorming op die worteloppervlak na 18 dae. Die konidiofoor ontwikkel uit ektotrofiese hifes. (SEM) Balkie 20 $\mu$ m.

Fig. 4.9.2 Konidiofore wat 14 dae na planting uit die onderliggende korteksweefsel deur die worteloppervlak dring. 'n Konidiofoor (KF) het tussen twee epidermisselle na buite gegroei (pyl) en 'n ander (KF geen pyl) direk deur die epidermisselwand. (SEM) Balkie 10 $\mu$ m.

Fig. 4.9.3 Intrazellulêre konidiogenese (K) in 'n wortelkortekssel 18 dae na plant. (SEM) Balkie 10 $\mu$ m.

Fig. 4.9.4 Interzellulêre konidiogenese (K) in nekrotiese gekoloniseerde korteksweefsel. (28 dae na plant) (SEM, Polietileenglikol voorbereiding) Balkie 40 $\mu$ m.



FIGUUR 4.10.1 - 4.10.2 Skandeerelektronmikrograwe (SEM) om die oorlewingsstrukture wat deur E. pedicellatum gevorm word te toon.

Simbole: K-konidium, KW-korteksweefsel, VW-vaatweefsel.

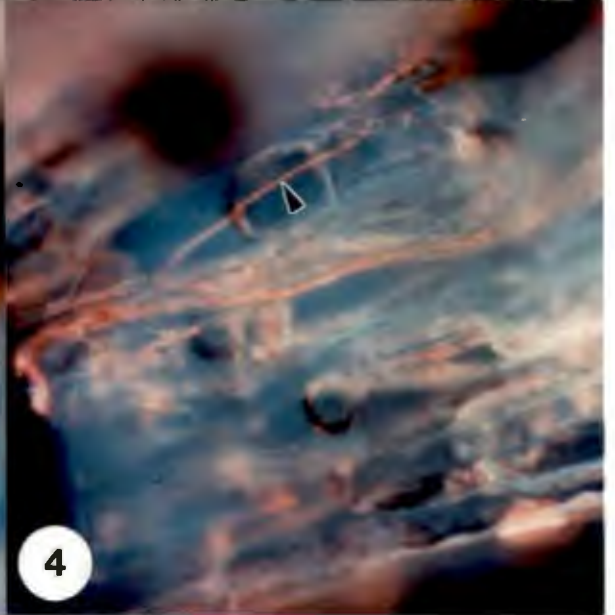
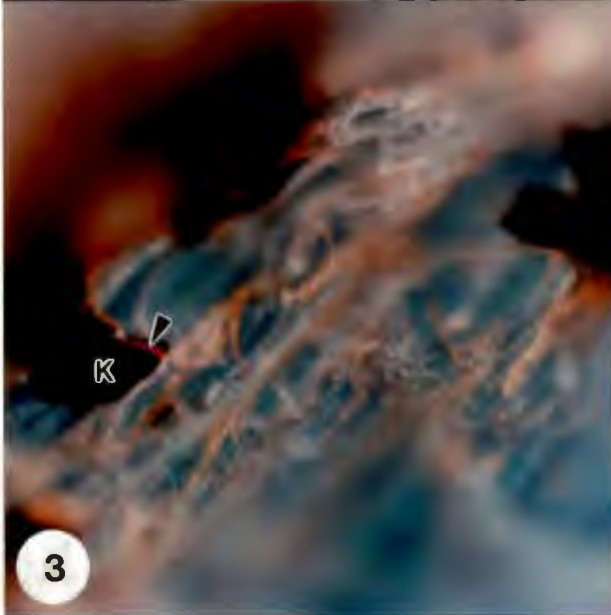
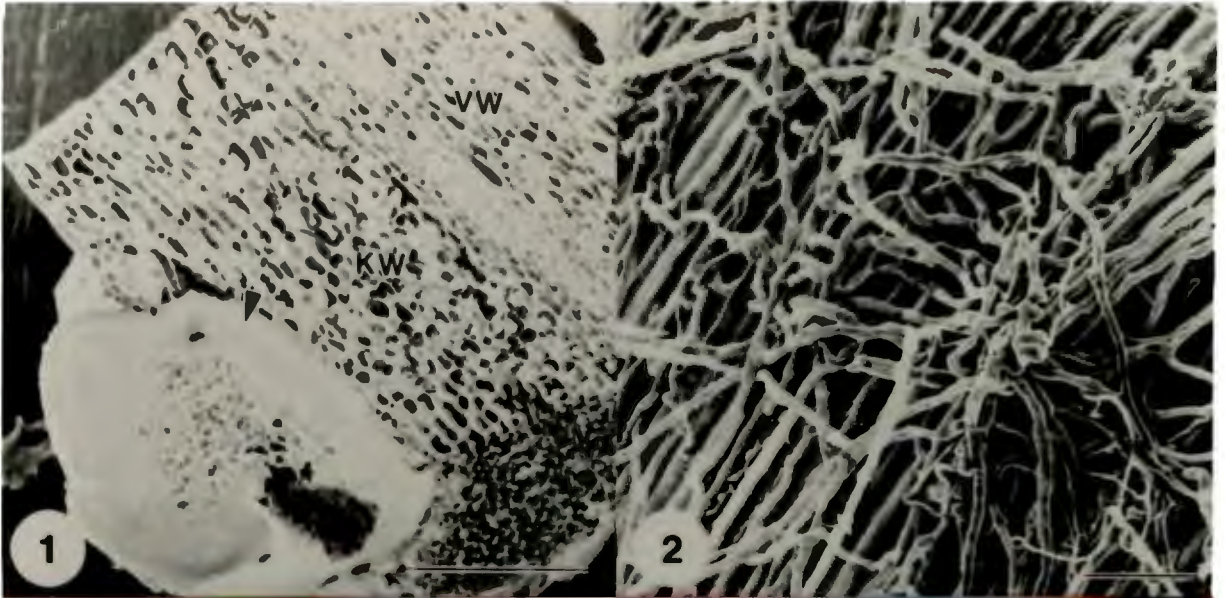
Fig. 4.10.1 'n Stroma-agtige hifemassa (pyl) wat 28 dae na plant in die mesokotielkorteks voorgekom het en deur die oppervlak strek. Die weefsel naasliggend tot die struktuur toon disintegrasie van die selle. (SEM, Polietileenglikol voorbereiding) Balkie 400 $\mu$ m.

Fig. 4.10.2 Digte ineengestrengelde hifes op die mesokotieloppervlak 28 dae na planting wat sklerotiumagtige infeksiekussings (pyl) is. (SEM) Balkie 40 $\mu$ m.

FIGUUR 4.10.3 - 4.10.4 Differensiële europiumchelaat fluoresensie as aanduiding van die lewenskragtigheid van E. pedicellatum hifes (pylle) op die worteloppervlak.

Fig. 4.10.3 Kiembuis (pyl) van die patogeen 36 uur na inokulering in WI-toestel.

Fig. 4.10.4 'n Hife (pyl) van die patogeen 14 dae na inokulering in WI-toestel.



Tabel 4.1 Die invloed van die fungusmetaboliet op wortel- en mesokotielontwikkeling van mieliesailinge

Plantdeel	Kriterium	Mielielyn	Metaboliettoediening (M) of Kontrole (K)	Gemiddeld mm/gr	Z'
Wortel	Lengte	A471W	M	53,45 (3)	a
			K	113,73 (2)	b
		AX305W	M	22,73 (4)	a
			K	185,45 (1)	c
	Massa	A471W	M	0,21 (2)	d
			K	0,16 (3)	d
		AX305W	M	0,06 (4)	e
			K	0,27 (1)	f
Mesokotiel	Lengte	A471W	M	90,09 (3)	h
			K	128,73 (1)	g
		AX305W	M	73,09 (4)	h
			K	118,36 (2)	g
	Massa	A471W	M	0,44 (3)	i
			K	0,50 (2)	i
		AX305W	M	0,25 (4)	j
			K	0,53 (1)	i

Volgens Newman - Keuls - Toets

Z': Waardes met dieselfde letters verskil nie betekenisvol van mekaar nie

oorlewing is, aangesien dit oor dik, donker gepigmenteerde selwande beskik.

Die oppervlakmiselium is ook moontlik vir oorlewing en verdere koloniserings van die weefsel verantwoordelik aangesien die hifes lewenskragtig bly. Die europiumchelaat fluoressensie-tegniek van Anderson en Slinger (1975) is gebruik om die lewenskragtigheid van uitwendige hifes te bepaal. Met hierdie tegniek veroorsaak die nukleïensuurkonsentrasie van hifeselle 'n rooi fluoressensie wat op lewenskragtigheid dui. Die hifes op die worteloppervlak het 36 uur (fig. 4.10.3) en 14 dae (fig. 4.10.4) na inokulering rooi gefluoresseer en daarom kan aanvaar word dat dit wel nog metabolies aktief is.

#### 4.6 Invloed van die fungusmetaboliet op groei van saailinge en die ultrastruktuur van wortelweefsel

Die wortel- en mesokotiellengtes van die metabolietbehandelde plante in sowel die A471W as die AX305W-lyn verskil betekenisvol van die kontroleplante. Daar is geen betekenisvolle verskil betreffende die gemiddelde wortelmasse van behandelde en kontroleplante in die A471W-lyn nie. Daar was wel 'n betekenisvolle verskil wat betref wortelmasse in die AX305W-lyn. Die A471W-lyn toon ook wat betref die mesokotielmasse geen betekenisvolle verskille tussen die behandelde en die kontroleplante nie maar weereens toon die AX305W-lyn betekenisvolle verskille. Die AX305W-lyn lewer in die kontroles van die vier ondersoeke telkens goeie resultate terwyl dit elke keer met die toediening van die metaboliet die swakste groei lewer. (Tabel 4.1)

Die wortel- en mesokotiellengtes van behandelde plante in beide mielielyne word dus deur die geëkstraheerde fungusmetaboliet beperk. Wortel- en mesokotielmasse word slegs by die AX305W-lyn

deur die toediening van die metaboliet beperk. Die AX305W-lyn word meer as die A471W-lyn deur die metaboliet benadeel. Die fungusmetaboliet blyk dus toksies te wees, aangesien dit wortel- en mesokotielgroei betekenisvol geïnhibeer het.

Die wortels wat met behulp van die WI-toestel met die metaboliet behandel is, het na 4 uur slegs 'n effense verkleurde gedeelte getoon. Na 48 uur was die letsels ligbruin en die wortel effens vernou. Die worteldeursnee het onder die letsel weer 'n normale deursnee gehad. Geen verdere letseluitbreiding het plaasgevind nie, maar onderkant die vernoude gedeeltes het abnormale sywortelontwikkeling voorgekom (fig. 4.11.1). Dit is nie by die kontrolemateriaal waargeneem nie.

Vier uur na die toediening van die fungusmetaboliet op die worteloppervlak was daar reeds opvallende degenerasie van die sitoplasma van die korteksselle. Die enigste organelle wat as sodanig herken kon word, was die mitochondrions. Die buitemembraan van die mitochondrions was reeds in 'n gevorderde stadium van degenerasie en die mitochondriale kristas kon nie meer waargeneem word nie (fig. 4.11.2). In vergelyking was die kontroles se voorkoms normaal (fig. 4.11.3). Geen ander membraansisteme en organelle was herkenbaar in die toksienbehandelde wortels nie.

Volgens die gedegenerende voorkoms van die mitochondrions asook die afwesigheid van ander organelle en membrane kan die selle dus nie meer funksioneer nie. Dit word bevestig deur Aldrich et al. (1977) en Hanchey (1981) wat bevind het dat mitochondrions van mieliewortelselle wat aan geëkstraheerde HMT-toksiene blootgestel is, geswolle is, minder kristas het en vermindering in die digtheid van die matriks toon. Aldrich et al. (1977) het ook bevind

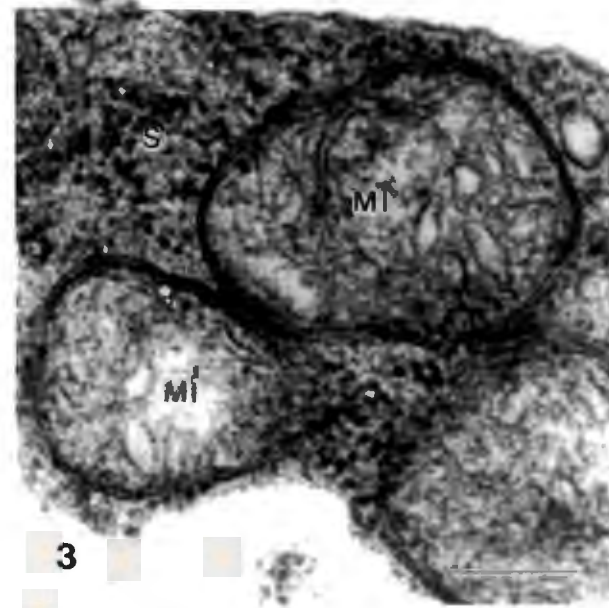
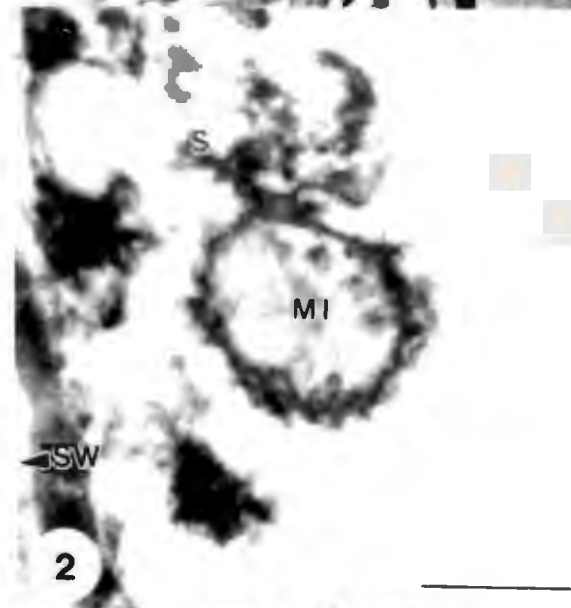
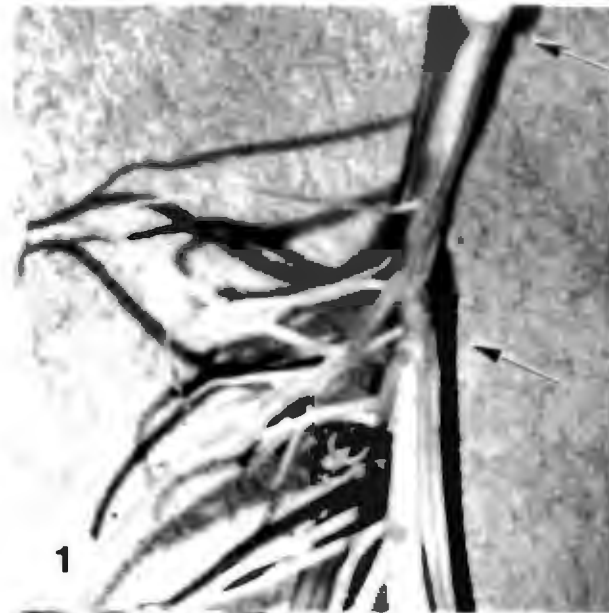
FIGUUR 4.11 Die effek van die geëkstraheerde fungusmetaboliet op wortelontwikkeling en die ultrastruktuur van selle na die toediening van die metaboliet

Simbole: MI-mitochondrion, S-sitoplasma, SW-selwand.

Fig. 4.11.1 'n Mieliewortel wat vier dae na die toediening van die fungusmetaboliet (in WI-toestel) 'n vernoude gedeelte getoon het (tussen pylle) op die plek waar die metaboliet toegedien is. Let na die terugkeer tot 'n normale deursnee onder die vernoude gedeelte (pyl) en die abnormale sekondêre sywortelontwikkeling na wat na sewe dae onder die letsel voorgekom het.

Fig. 4.11.2 Transmissie-elektronmikrograaf (TEM) van 'n metabolietbehandelde kortekssel wat degenerasie van die sitoplasma en mitochondrions, vier uur na toediening van die fungusmetaboliet, toon. Balkie  $0,25\mu\text{m}$ .

Fig. 4.11.3 Die sitoplasma van 'n kortekssel wat nie aan die fungusmetaboliet blootgestel is nie. (TEM) Balkie  $0,2\mu\text{m}$ .



dat mitochondrions van vatbare toksien-aangetaste weefsel nie meer normaal kan funksioneer nie.

Toksiene of toksiese metaboliete, wat 'n primêre of sekondêre rol in patogeenese mag speel, is verantwoordelik vir strukturele en funksionele versteuring van membraansisteme (Cooper, 1981). White en Taniguchi (1972) meld dat verskeie fungustoksiene primêr die selmembrane aantas. Die toksiene lei tot die versteuring van die beweging van opgeloste stowwe wat dan die algemene verlies van subsellulêre integriteit en die versteuring van die selmetabolisme tot gevolg het. Die versteuring van die selmetabolisme deur die toksien kan die gasheerweerstand verlaag sodat die siekte-ontwikkeling verder strek as die direkte effek van die toksien self. Die ultrastrukturele veranderinge kan lank na die fisiologiese veranderinge eers manifesteer en die waarneembare veranderinge kan sekondêr wees (Hanchey, 1981).

In my ondersoek was dit nie moontlik om te bepaal of die skynbare toksiese fungusmetaboliet 'n primêre of 'n sekondêre rol in die patoogen-gasheer verhouding speel nie. Die toksien mag egter bydra tot die besonder vinnige disorganisasie van die selinhoud deur die fungus.

Scheffer en Briggs (1981) meen dat 'n patoogen se ensiemkompleks, die toksiese metaboliet(e) en die onttrekking van selbestanddele deur die patoogen, lei tot die versteuring van die selinhoud en die selmetabolisme. Hierdie versteuring word gevolg deur selnekrose (Wood, 1972). Na die nekrose van die korteks- en epidermisselle volg lise en disintegrasie van die gekoloniseerde weefsel.

#### 4.7 Die effek van selwand-afbrekende ensieme op geïnfecteerde wortel- en mesokotielweefsel

Die behandeling van ongeïnfekteerde wortels met Cellulysin (sellulase) en Macerase (pektinase) het gelei tot die totale dis-integrasie van weefsels. Die enigste weefseltipes wat tot 'n mate behoue gebly het, was die epidermis met wortelhare, die endodermis en vaatweefsel. Laasgenoemde was ook in 'n hoë mate gemasereer. Geen korteksselle kon herken word nie.

Die blootstelling van die geïnfekteerde wortels aan dieselfde ensieme het teenstellende resultate gelewer. Die epidermis, die endodermis en van die vaatweefsel van die wortels en mesokotiele het behoue gebly. (Fig. 4.12.1). Die kortekswefsel wat deur die patogeen gekoloniseer is, het ook geen of min tekens van ensiematiese afbraak getoon nie (fig. 4.12.1 en fig. 4.12.2). Die gedeeltes van die korteks van geïnfekteerde wortels wat nie deur die patogeen gekoloniseer is nie, is bykans heeltemal deur die ensieme afgebreek (fig. 4.12.1). Die drie tot vier ongeïnfekteerde kortekssellae wat teen die geïnfekteerde gedeelte geleë is, het geen teken van ensiematiese afbraak getoon nie. Die gekoloniseerde selle en die naasliggende ongeïnfekteerde selle het in die aanwesigheid van die patogeen 'n verandering in samestelling ondergaan wat dit ensiembestand gemaak het. Die ensieme het geen nadelige effek op die voorkoms van die fungushifes gehad nie (fig. 4.12.2 en fig. 4.12.3).

Daar is nie 'n voor die hand liggende verklaring vir die onvermoë van die kommersiële ensieme om die selwande van die geïnfekteerde kortekswefsel in die letselarea af te breek nie. Dit kan aan die inaktivering van die ensieme of aan verandering van die selwandsamestelling toegeskryf word.

Volgens Kurosaki et al. (1986) sal die aanwesigheid van fungusstrukture en hul hidrolitiese ensieme die produksie van

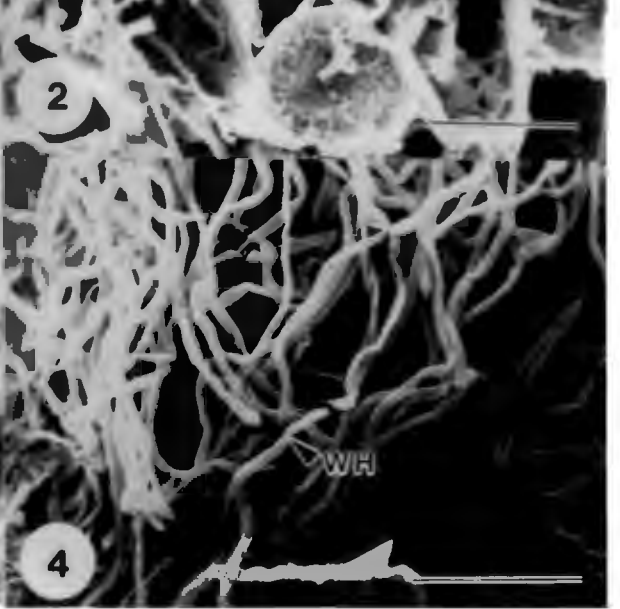
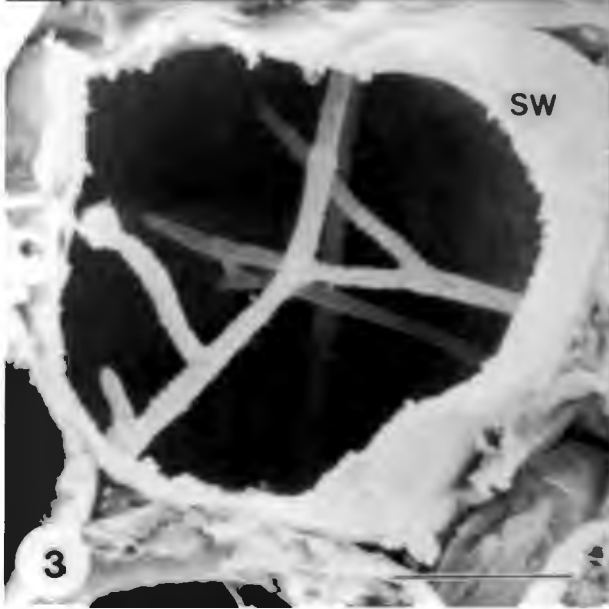
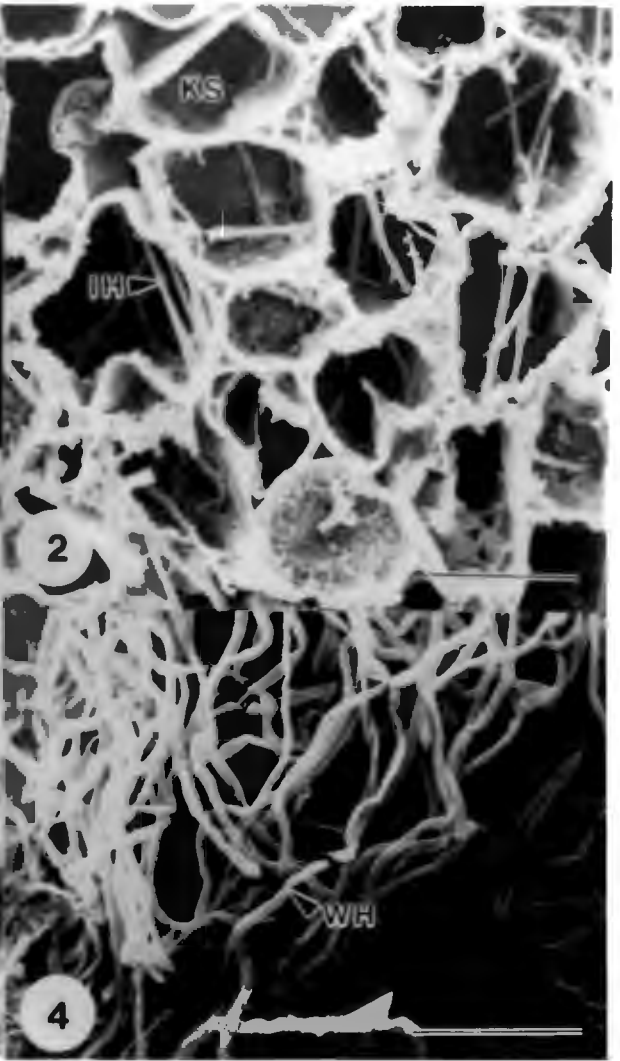
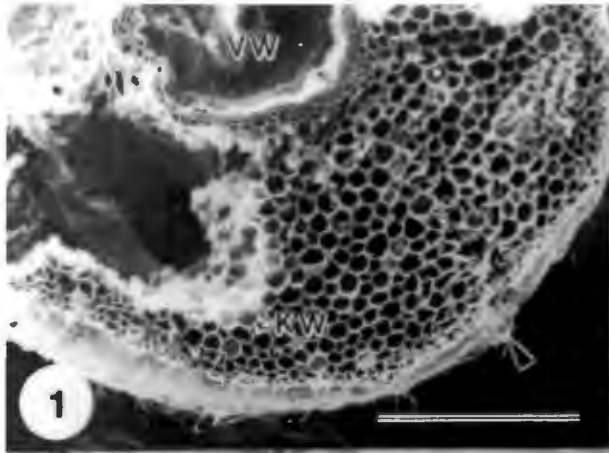
FIGUUR 4.12 Skandeerelektronmikrograwe van geïnfekteerde wortelweefsel wat aan sellulase en pektinase blootgestel is

Simbole: IH-intercellulêre hife, KS-korteksel, KW-korteksweefsel, SW-selwand, VW-vaatweefsel, WH-wortelhaar.

Fig. 4.12.1 Dwarssnee van 'n geïnfekteerde mesokotiel waarvan die sitoplasma na ensiembehandeling verwyder is, agt dae na inokulasie in WI-toestel. Die intakte gedeelte van die korteksweefsel (KW) waar letselontwikkeling plaasgevind het, is nie deur die ensieme afgebreek nie. Waar geen kolonisasie was nie is die korteksweefsel en die vaatweefsel bykans heeltemal deur die ensieme verteer. Die pyltjie dui die aanvanklike infeksie-lokus aan. Balkie 0,5mm.

Fig. 4.12.2 en 4.12.3 Hoër vergrotings van die korteksweefsel in fig. 4.12.1 om aan te toon dat die gekoloniseerde weefsel nie deur die ensieme afgebreek is nie. Fig. 4.12.2 balkie 50 $\mu$ m en fig. 4.12.3 balkie 20 $\mu$ m.

Fig. 4.12.4 Wortelhare (WH-pyl) van ensiembehandelde wortels wat nie deur die ensieme afgebreek is nie. (SEM) Balkie 100 $\mu$ m.



fitoaleksiene en die akkumulاسie van fenoliese verbindings induseer. Die oksidasieprodukte van fenoliese verbindings (Bateman & Millar, 1966) en ander komplekse verbindings uit dooie selle kan vir die inaktivering van pektiese ensieme en sellulase verantwoordelik wees (Wood, 1972). Patil en Dimond (1967) meld die inhibering van poligalakturonase afkomstig van Verticillium albo-atrum deur geoksideerde fenole en dat akkumulاسie van fenole en die oksidasie daarvan bespoedig word indien verwonding van die plantweefsel plaasvind. Die oksidasieprodukte inaktiveer net die gemelde ensieme en het blykbaar geen effek op die patogeen nie (Schönbeck & Schlösser, 1976). Bateman en Basham (1976) meen dat die oksidasieprodukte van fenoliese verbindings in geïnfekteerde weefsel nie-spesifiek is en dat dit alle ensieme kan beïnvloed.

Wood (1972) meld dat die samestelling van selwande kan verander in reaksie op selwandafbrekende ensieme wat tot gevolg het dat die vatbaarheid van selwande vir die ensieme verminder word. In die verband toon Vance et al. (1980) aan dat selwande kan lignifiseer in reaksie op die aanwesigheid van ensiemsekreterende hifes. Die reaksie moet volgens Hammerschmidt (1984) vinnig na infeksie plaasvind en naby die patogeen geleë wees om 'n primêre rol in die belemmering van die fungusgroei te kan speel. Aangesien die mieliewortels nie suksesvol in die voorkoming van wortelkoloniasie en -degenerasie is nie, kan die verskynsel bloot as 'n aanvangs-verdedigingsmeganisme beskou word wat deur E. pedicellatum oorkom word.

HOOFSTUK VYF  
SAMEVATTENDE BESPREKING

Volgens Shepherd et al. (1967) het die infeksie, asook die nekrose van wortels en wortelgedeeltes soos deur Exserohilum pedicellatum veroorsaak, geen stremmende invloed op die boggrondse dele van die mielleplante nie. Die gegewens wat met die ondersoek verkry is, verskil egter met die bevindings van die gemelde outeurs. Aanvanklik was daar geen verskil in die voorkoms van boggrondse plantdele van die geïnfekteerde en kontroleplante nie, maar vanaf 11 dae na plant was die geïnfekteerde plante korter. Die blare het ook vergeling getoon en die blaarpunte sterf af in die gevorderde stadiums van infeksie maar geen saailingsterftes het egter voorgekom nie. Daar was ook geen waarneembare verskille tussen die miellelyne A471W en AX305W nie. Infeksie van die wortels deur E. pedicellatum het letselontwikkeling en verminderde by- en sywortelontwikkeling tot gevolg gehad en dit bevestig die bevindings van Shepherd et al. (1967) in die verband. Die gemelde stremming van die boggrondse plantdele kan moontlik aan die verminderde wortelontwikkeling toegeskryf word. Dit is volgens die verkrygte data moontlik dat die stremming ook aan die invloed van die fungusmetaboliet toegeskryf kan word, aangesien dit saailingontwikkeling asook die wortel-ultrastruktuur benadeel. Sekondêre sywortelvorming bo en onder die letsels het wel in 'n mate na infeksie, en ook met die toediening van die geëkstraheerde fungusmetaboliet, plaasgevind. Die vaatweefsel blyk tot 24 dae na aanplanting funksioneel te wees waarna die fungus dit gekoloniseer het, soos ook deur Sonderhousen en Boothroyd (1965) bevind. Die kolonisering van die vaatweefsel geskied eers nadat stremming van plantgroei reeds 'n aanvang geneem het en dit kan 'n bydraende effek hê.

Die ontkieming van die konidiums en appressoriumvorming vind reeds binne 24 uur na inokulering plaas. Die kiembuis of hifes gee terminaal of interkalêr aan enkelvoudige appressoriums oorsprong. Enkelvoudige appressoriumtipes gee soms aan meervoudige appressoriums oorsprong. Dikwandige, donker gepigmenteerde, sklerotiumagtige infeksiekussings word ook deur E. pedicellatum op die worteloppervlak gevorm. Appressoriumvorming vind op die oppervlak van wortel- en mesokotielepidermisselle, maar veral by die intersellulêre kontakzone tussen epidermisselle plaas, soos ook deur Sonderhousen en Boothroyd (1965) waargeneem. Verhoogde eksudaatproduksie by dié lokus wat deur Bowen & Rovira (1976) voorgestel is, is moontlik 'n verklaring. Die basisse van wortelhare en interkalêre gedeeltes van wortelhare dien ook as lokus vir appressoriumvorming. Die vorming van appressoriums is tot die relatief ontwikkelde gedeeltes van die saailingwortels en die mesokotiel beperk. In die literatuur is daar geen verwysing na wortelpunt-infeksie deur die patogeen nie. Ten spyte van direkte inokulering op die wortelpunt met behulp van die WI-toestel was geen appressoriumvorming op die gedeelte waargeneem nie. E. pedicellatum is blykbaar nie in staat om die wortelpunt en die ongedifferensieerde weefsel na aan die wortelpunt, as 'n infeksielokus te gebruik nie. Die wortelgedeelte beskik dus moontlik oor 'n natuurlike immuniteit teen infeksie. Die rede hiervoor is nie bekend nie. Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici en Verticillium albo-atrum as patogene van tamaties asook F. oxysporum f. sp. pisi as patogeen van ertjies, is daarenteen voorbeelde van fungusse wat wel oor die vermoë beskik om wortelpunte as infeksielokus te benut (Bishop & Cooper, 1983).

Hifes van E. pedicellatum is vanaf 96 uur na inokulering met die WI-toestel, in die wortelkorteksselle waargeneem. Die vorming van 'n vernoude infeksiehife by die kontakzone tussen die appres-

sorium en die gasheerselwand (Sonderhousen & Boothroyd, 1965) is 'n voorvereiste vir indringing. Die penetrasiestrukture van E. pedicellatum is in staat om selwande in klein areas ensiematies af te breek. Deur gebruik te maak van die koperoksiedpresipitaattoets (Bal, 1974) is bevind dat sellulase deel is van die patogeen se ensiemkompleks. Dit het duidelik geblyk dat ook selwande direk aangrensend aan die fungushifes onderhewig is aan die werking van die ensiem sellulase, wat verder kan bydra tot die degenerasie van geïnfecteerde kortekswefsel. Die patogeen is in staat om die openinge in die gasheerselwande wat deur ensiematiese werking ontstaan het, op 'n meganiese wyse effens te vergroot, aangesien selwanddele omgebuig word waar penetrasie plaasvind. Dit dui ook daarop dat meganiese kragte 'n rol speel by die kolonisasie van weefsels. Benewens aktiewe ensiematiese indringing is die patogeen in staat om gasheerwortels op 'n passiewe wyse in te dring deur van die openinge tussen die bywortel en die nuutgevormde sywortels gebruik te maak, wat dan die vermoede van Du Toit (1966) bevestig.

Uit die voorafgaande bespreking van die penetrasiefase is dit duidelik dat E. pedicellatum as 'n aktiewe wortelpatogeen beskou kan word, wat onder gunstige omstandighede uitgebreide wortelinfeksie kan veroorsaak. Dit bevestig die bevindings van Sonderhousen en Boothroyd asook dié van Du Toit (1966).

Alhoewel appressoriumvorming algemeen voorkom, is dit nie net tot die gasheeroppervlak beperk nie. Die vorming daarvan vind ook plaas indien die patogeenhifes 'n sel vanaf 'n intersellulêre ruimte binnedring of as die hife van een sel na 'n aangrensende sel groei, wat ook 'n bevestiging is van die effektiewe kolonisasievermoë van die patogeen. Die kolonisasie van die wortelkortekswefsel geskied vinnig, aangesien die patogeen aan-

vanklik hoofsaaklik van lengteverlopende intersellulêre ruimtes gebruik gemaak. In die sentrale deel van 'n jong letsel kom intra- en intersellulêre kolonisasie voor, terwyl kolonisering aan die periferie van letsels oorwegend intersellulêr van aard is met 'n geringe mate van intrasellulêre kolonisering. Die patogeen kan ook wortelhare koloniseer deur dit direk van buite te penetreer of deur dit vanaf die interne geïnfekteerde wortelweefsel te koloniseer.

Die patogeen is in staat om die kortekswaefsel binne 7 dae tot teen die endodermis, met hoofsaaklik intersellulêre hifes, te koloniseer. Die vaatweefsel bly egter vir 'n geruime tyd na die kolonisering van die kortekswaefsel steeds funksioneel (Shepherd et al., 1967). Tot 24 dae na aanplanting is die patogeen nie in staat om die onderliggende endodermis en vaatweefsel te koloniseer nie. Die fungus is 28 dae na aanplanting in die vaatsilinder in xileem waargeneem. Sonderhousen en Boothroyd (1965) en Shepherd et al. (1967) het ook kolonisasie van die vaatsilinder waargeneem, maar meld dat dit slegs na gevorderde kolonisering moontlik was, geen tydsverloop word vermeld nie. Die wyse waarop die hifes toegang tot die houtvate verkry het, kon nie vasgestel word nie en daar is geen verwysing daarna in die literatuur. Die bevestiging van die vermoë van die patogeen om die vaatsilinder te penetreer, ruim die vermoede dat E. pedicellatum 'n swak patogeen is, uit die weg. Dit blyk dat die endodermis van die mieliewortels, soos in die geval van ertjies en tamaties (Bishop & Cooper, 1983), as 'n bepalende streek beskou kan word omdat dit voorkom dat die patogeenhifes vinnig in die vaatweefsel kan vestig.

Konidiumvorming deur ektotrofiëse hifes asook die vorming daarvan in die gekoloniseerde kortekswaefsel en weer op die wortelop-

pervlak met die interne hifes as oorsprong, verseker dat die reproduksiefase suksesvol is. Konidiumvorming in die korteksweefsel, soos ook deur Sonderhousen en Boothroyd (1965) en Du Toit (1966) bevind, vind intra- of intersellulêr plaas. Du Toit (1966) maak ook melding van die aanwesigheid van chlamidospore in dié weefsel. Dit kon egter nie bevestig word nie.

E. pedicellatum gee ook soms oorsprong aan 'n stroma-agtige struktuur wat in die mesokotielweefsel ingebed is. Omdat daar geen oorlewingsstudies gedoen is nie, kon dit nie bevestig word dat die strukture by oorlewing betrokke is nie. Digte ineen-gestrengelde miselium wat as oorlewingsstrukture kan dien, is ook op die gasheeroppervlak waargeneem. Dié sklerotiumagtige infeksiekussings wat deur die patogeen gevorm word en wat ook vir penetrasie verantwoordelik is, kan volgens Emmett en Parbery (1975) moontlik 'n rol by oorlewing speel, aangesien dit oor dik, donker gepigmenteerde selwande beskik.

Die hifes op die worteloppervlak bly steeds lewenskragtig soos bepaal met dié differensiële fluoressensiemikroskopie. Dit kan moontlik vir verdere primêre of sekondêre infeksies verantwoordelik wees. Of dit egter onder veldtoestande ook die geval sal wees, kan nie bevestig word nie, omdat geen toetse in die opsig gedoen is nie.

Van die eerste waarneembare effekte van die patogeen op die ultrastruktuur van gasheerselle is die aggregasie van sitoplasma om die indringende hife of in die gedeeltes van gasheerselle aanliggend of naasliggend tot intersellulêre hifes. Die verskynsel is ook gevind in tamatiewortels wat deur Verticillium albo-atrum geïnfekteer is (Bishop & Cooper, 1983). Die geaggregeerde sitoplasma kon blykbaar nie soos in die geval van V. albo-atrum

die kolonisering deur E. pedicellatum stuit nie. Die geaggregeerde gasheersitoplasma ondergaan in so 'n mate lise dat die organelle strukturele integriteit verloor.

Die versteuring van die membraansisteen in gasheerselle in so 'n mate dat dit nie duidelik gedefinieerd waarneembaar is nie, is volgens Hislop en Pitt (1976), 'n vroeë waarneembare effek van 'n patogeen in gasheerselle en dit word bevestig deur die bevindings van die ondersoek. Volgens Harvey (1977) het Pleiochaeta setosa dieselfde effek op die membrane van selle in lupienblare wat dan lei tot die vermenging van die sitoplasma en dus die versteuring van die selinhoud. Die stellings in die oorsig van Cooper (1981) word bevestig deurdat mitochondrions in selle van E. pedicellatum geïnfekteerde weefsel, van die laaste organelle was om na infeksie 'strukturele verlies te toon. Die buitenste membraan het, alhoewel dit onderbroke vertoon het, redelik behoue gebly, maar die mitochondriale kristas was of verwronge of glad nie meer herkenbaar nie. 'n Verdere sigbare effek was die verandering aan die amorfe selwande aanliggend tot penetrasie hifes wat verandering in struktuur en elektroneutraliteit getoon het. Dit is volgens Aist (1976) die gevolg van ensiematiese werking. Daar is ook dun intrasellulêre selwandneerleggings in geïnfekteerde selle en in sommige selle wat naasliggend tot koloniserende hifes is. Cooper (1981) is van mening dat die vorming daarvan moontlik aan die aggregasie van sitoplasma in die geïnfekteerde selle toegeskryf kan word.

In hierdie ondersoek is intersellulêre neerleggings in die gekoloniseerde korteksweefsel waargeneem. Dit is tydens die gevorderde stadiums van kolonisasie gevorm. Die oorsprong van die neerleggings is onbekend. Indien dit van gasheeroorsprong is, is die funksie daarvan nie duidelik nie, aangesien die korteksweef-

sel reeds voor die vorming daarvan, grootliks gekoloniseer was. Du Toit (1966) maak ook net melding van 'n "gomagtige stof" wat tydens die gevorderde stadiums van kolonisasie in die wortelkorkweefsel aanwesig is, maar hy verskaf geen verklarende inligting nie.

Ten spyte van die aggregasie van sitoplasma en die vorming van intersellulêre neerleggings, wat moontlike verdedigingsreaksies van die gasheerselle is, is die patogeen in staat om die degenerasie van die selinhoud te veroorsaak. Dit is verdere bevestiging dat die patogeen in staat is om nekrose van gasheerselle en die daaropvolgende weefseldisintegrasie aktief te bewerkstellig.

Om 'n fungusmetaboliet as 'n toksien te geklassifiseer, moet dit primêr oor die vermoë beskik om by 'n redelike konsentrasie, alle simptome of sommige van die simptome wat kenmerkend van die sieketoestand is, te veroorsaak (Luke & Gracen, 1972; Strobel, 1974; Daly, 1981). Die toksien moet ook noodsaaklik vir die patogenisiteit van die patogeen wees (Scheffer & Yoder, 1972). Toksiene metaboliete wat nie aan die nodige kriteriums voldoen nie, kan wel sekondêre funksies vervul en so 'n bydrae tot die virulensie van die patogeen lewer (Wheeler, 1981). Toksiene kan vir die predisponering van gasheerweefsel verantwoordelik wees om sodoende die kolonisering van die weefsel te bevorder (Comstock & Scheffer, 1973; Wheeler, 1981; Scheffer & Livingston, 1984).

Die resultate wat na die toediening van die geëkstraheerde fungusmetaboliet verkry is, toon ooreenkoms met die resultate wat na die infeksie van mieliewortels deur E. pedicellatum verkry is. Die fungusmetaboliet het, na toediening op die worteloppervlak, vernoude bruinerige letsels asook verandering in die ultrastruk-

tuur van wortelselle tot gevolg gehad. Daar was vier uur na die toediening van die fungusmetaboliet bykans geen ultrastrukturele behoud in die sitoplasma van die korteksselle nie. Die mitochondrions het na toediening geen of uiters geringe behoud van die buitenste membraan en die mitochondriale kristas getoon. 'n Soortgelyke effek van HMT-toksien op mitochondrions van mieliewortels word deur Aldrich et al. (1977) bevestig. Geen membraansisteme en ander organelle was herkenbaar nie. Toksiene het meestal veranderinge in sitoplasmiese membrane (Hanchev, 1981) en mitochondrions (Aldrich et al., 1977; Park et al., 1981) as primêre effek. Bogenoemde afwykings was ook aanwesig in selle wat nie gekoloniseer is nie, soos ook veroorsaak deur metaboliete van Rhizoctonia solani in suikerbeetwortels (Ruppel, 1973).

Na toediening van die metaboliet met behulp van die WI-toestel het die worteldeursnee, indien verdere groei toegelaat is, onder die vernoude letsels weer normaal vertoon. Onder die vernoude gedeeltes het 'n abnormale hoeveelheid sywortels, wat nie by die kontrolemateriaal aanwesig was nie, ontstaan. Dit kan moontlik aan die effek van die metaboliet toegeskryf word, aangesien fungustoksiene volgens Daly (1981) vir groeiabnormaliteite verantwoordelik kan wees. Daarbenewens het die metaboliet 'n inhiberende invloed op saailinggroei en wortelontwikkeling.

Die metaboliet, hetsy as primêre of sekondêre determinant in patogenese, blyk dus toksies te wees, aangesien dit vir die strukturele en funksionele versteuring van die selorganisasie van korteksweefsel asook vir die inhibering van wortel- en mesokotielontwikkeling verantwoordelik is. Die fungusmetaboliet kan dus tesame met die invloed van die koloniserende hifes, vir die simptomatologie van die siektetoestand verantwoordelik wees. Aangesien die doel van die deel van die ondersoek bloot was om

vas te stel of die patogeen moontlik oor 'n toksiese metaboliet beskik wat by patogenese betrokke is, is die metaboliet nie in detail bestudeer nie. Die presiese aard en werking van die metaboliet verdien verdere aandag.

Tydens die ondersoek na die infeksieproses deur die patogeen, is gebruik gemaak van die ensieme sellulase en pektinase om die selwande van die gekoloniseerde weefsel te verwyder en dus sodoende die interne fungusstrukture bloot te lê. Die kortekswaefsel wat deur die patogeen gekoloniseer is, het egter geen of min tekens van ensiematiese afbraak na blootstelling aan die ensieme getoon. Kortekswaefsel wat direk naasliggend tot die gekoloniseerde weefsel geleë was, is ook nie deur die ensieme afgebreek nie. Die aanwesigheid van E. pedicellatum in die weefsel het dus veranderinge veroorsaak wat tot gevolg het dat ensiematiese afbraak van die geïnfekteerde selle se selwande, deur die gemelde ensieme, nie moontlik was nie. Dit kan aan die inaktivering van die ensieme deur fitoaleksiene (Kurosaki et al., 1986) asook aan die akkumulering van fenoliese verbindings en oksidasie produkte van die fenole (Bateman & Millar, 1966; Patil & Dimond, 1967; Schönbeck & Schlösser, 1976) toegeskryf word. 'n Verandering in die samestelling van die selwande in reaksie op die aanwesigheid van die fungus en fungusmetaboliete, kan die bestandheid van die selwande teen die ensieme moontlik ook verklaar. Volgens Vance et al. (1980) en Hammerschmidt (1984) kan lignifisering van die selwande, in reaksie op 'n patogeen, die groei van die patogeen in die weefsel rem. Aangesien E. pedicellatum wel oor die vermoë beskik om die wortelweefsel suksesvol te koloniseer, kan die meganismes moontlik bloot as 'n verdedigingspoging beskou word. Die aspek van die gasheer-patogeen-verhouding verdien egter verdere aandag.

## BYLAES

### Bylae A: Deeltjiegrootte-ontledingsverslag van MCU-graad vermikuliet

2,0	- 0,5	mm	4,1%
0,5	- 0,2	mm	56,1%
0,2	- 0,02	mm	31,9%
0,02	- 0,002	mm	3,2%
0,002	>	mm	4,8% (Landbounavorsingsinstituut : Potchefstroom Grondkundeseksie Deeltjiegrootte-ontledingsverslag Verslag nr 174/82 1982 )

### Bylae B: F.A.A.

96% etanol	50ml
Asynsuur	5ml
37% formaldehyd	10ml
Gedistilleerde water	35ml (Coetzee, 1982).

### Bylae C: Fikseeroplossing vir skandeer- en transmissie- elektronmikroskopie

Die fikseermiddel is 2,0g paraformaldehyd wat gesuspendeer is in 84,8 ml gedistilleerde water en dit is opgelos deur die byvoeging van 16 druppels 0,1N NaOH. Die oplossing is by 100ml 0,2M Nakkodilaatbuffer met 'n pH van 7,3 gevoeg waarna 16ml 25% glutaaraldehyd, 100mg CaCl<sub>2</sub> (0,005M) en 4,0g sukrose (0,05M) tot die bufferoplossing gevoeg is. Die fikseeroplossing se buffermolariteit was 0,1M. (Campbell & Drew, 1983).

#### Bylae D: Fluoresensie kleurmiddel

Voeg 8,0 mg van die fluoressensie verhelderaar (4,4'-bis(4-analien-6-bis(2-hidroksi-etiel)amino-S-triasien-2-alamien)2,2'-stilbeen disulfoonsuur) en 174 mg europium chelaat (europium(III) tionieltrifluoorasetaat) by 50ml absolute etanol en skud matig tot opgelos. Vul op tot 100ml deur gedistilleerde water stadig toe te voeg terwyl die oplossing geroer word. (Anderson & Slinger, 1975; Anderson, 1984).

#### Bylae E: Fosfaatbuffer

Vir die daarstelling van die buffer met 'n molariteit van 0,1M en 'n pH-waarde van 7,2 moet die volgende stappe gevolg word.

Oplossing A:  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  13,8g

Los op in gedistilleerde water en vul op tot 1000ml.

Oplossing B:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  14,2g

Los op in gedistilleerde water en vul op tot 1000ml.

Meng oplossings A en B tot die pH 7,2 en bêre in die yskas. Die buffer moet telkens vars berei word. (Coetzee, 1982).

#### Bylae F: Loodsitraat

$\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  1,33g

$\text{Na}_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7) \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  1,76g

Gedistilleerde water 30,00ml

Plaas in 50ml volumetriese fles en skud 30 minute.

Voeg 8,0ml 1,0N NaOH by die oplossing en vul op tot 50ml met gedistilleerde water. (Reynolds 1963).

Bylae G: Natriumkakodilaatbuffer vir skandeer- en transmissie-  
elektronmikroskopie

Aanvanklik is 'n 0,2M natriumkakodilaatbuffer saamgestel wat verdun is tot 0,1M. Om die buffer saam te stel is 42,8g  $[\text{Na}(\text{CH}_3)_2\text{AsO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}]$  in gedistilleerde water opgelos en opgevol tot 1000ml. Om die pH vas te stel is 10ml van 37% HCl by 603ml gedistilleerde water gevoeg. Om die buffer met 'n pH van 7,3 saam te stel is 7,0ml van die HCl-oplossing by 100ml van die Na-kakodilaatoplossing gevoeg. Om die pH van die buffer op 7,2 vas te stel is 8,2ml van die HCl-oplossing by 100ml van die Na-kakodilaatoplossing gevoeg. (Hayat, 1981). By 100ml van die 0,1M bufferoplossing is 3,42g sukrose opgelos en opgevol tot 200ml wat 0,05M sukrose in die 0,1M Na-kakodilaatbuffer met tot gevolg het. Die buffer met sukrose is aangewend om die materiaal te spoel na dit in verskillende oplossings geprosesseer is. (Hayat, 1981).

Bylae H: Paragon

30% etanol	50ml
Toluienblou	0,365g
Basiese fuchsien	0,135g

Los op en filtreer. (Coetzee, 1982)

Bylae I: Sørensen-fosfaatbuffer

Vir bereiding van 'n buffer met 'n molariteit van 0,1M en 'n pH waarde van 7,2 :

Oplossing A:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  35,61g

Los op in gedistilleerde water en vul op tot 1000ml.

Oplossing B:  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  27,6g

Los op in gedistilleerde water en vul op tot 1000ml.

Meng 36,0ml van oplossing A en 14,0ml van oplossing B en maak op tot 100ml met gedistilleerde water. (Hayat, 1981).

Bylae J: Spurr-inbedmedium

VCD (ERL 4206)	10g
NSA	26g
DER 736	6g
S1 (DMAE)	0,4g

Meng baie deeglik en bewaar in yskas vir kort tydperke. Laat die hars verwarm na kamertemperatuur voor gebruik. Hou altyd droog. (Coetzee, 1982).

Bylae K: Toksienproduksiemedium

Die ondergemelde verbindings is gebruik om die veranderde nr 3 Friesmedium saam te stel.

NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	.....	1,00 gr
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	.....	1,00 gr
NaCl	.....	0,10 gr
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	.....	0.50 gr
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	.....	0,13 gr
Ammoniumtartraat	.....	5,00 gr
Gisekstrak	.....	1,00 gr
Sukrose	.....	30,00 gr

Al bogenoemde stowwe word opgelos in een liter gedeïoniseerde water. (Pringle & Scheffer, 1963).

Bylae L: Uranielasetaat

Uranielasetaat 1g

Los op in 1ml 96% etanol en verdun na 20ml water.

Bedek die houer met aluminiumfoelie. (Coetzee 1982)

## Bylae M: Voedingsoplossing van die proefplante

### Makro-elemente

Verbinding	Konsentrasie
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,0005 M
$\text{KNO}_3$	0,0025 M
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,0025 M
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,001 M (Hageman <u>et al.</u> , 1961).

### Mikro-elemente

Verbinding	Konsentrasie
$\text{H}_3\text{BO}_3$	1,0 dpm B
$\text{MnO}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1,0 dpm Mn
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,1 dpm Zn
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,04 dpm Cu
$\text{H}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,02 dpm Mo (Grobbeelaar, 1963)

Ferrosulfaat is gebruik as ysterbron en is periodiek toegedien soos beskryf deur Hageman et al. (1961). Die ferrosulfaat is opgelos in gedeïoniseerde water wat met  $\text{H}_2\text{SO}_4$  aangesuur is tot pH 3,0. Met die aanvang van die eksperiment is die yster toegedien teen 'n konsentrasie van 3,5 dpm. Daar is verder elke derde dag addisionele toevoegings van die ysterverbinding gemaak teen konsentrasies van 1,75 dpm.

## ABSTRACT

THE ULTRASTRUCTURAL HISTOPATHOLOGY OF EXSEROHILUM PEDICELLATUM (HENRY) LEONARD & SUGGS DURING INFECTION OF MAIZE ROOTS.

The aim of this study has been to determine the interaction between the fungus pathogen and the host plant on an ultrastructural level. This pathogen is part of the root rot complex of maize.

Heat treated and surface sterilized seeds were planted in pathogen infested vermiculite in pots and also in custom made root inoculation devices. In addition to TEM, SEM and light microscopy, fluorescence microscopy as well as a histochemical procedure for the location of cellulase in infected root tissue, were employed to study the effect of root infection by the pathogen. The maize roots were, apart from microscopical techniques, exposed to an extracted fungus metabolite and commercial cellulase and pectinase in order to obtain more knowledge about the pathogen-host interaction.

This pathogenic fungus accomplished penetration of the host cell walls by means of enzymatic and mechanical mechanisms after the development of appressoria. E. pedicellatum was apart from active direct and intercellular penetration, capable of obtaining entrance to the inner tissue by means of passive penetration of wounds and natural gaps between primary and newly formed lateral roots.

Colonisation of epidermal and cortex tissue by the hyphae was acquired by longitudinal, radial and tangential inter- and intracellular growth within a short period of time. The colonisa-

tion of vascular tissue was only detected 28 days after planting. It seemed that the endodermis acted as an effective barrier to rapid invasion of the vascular tissue.

The reproductive phase comprised the production of conidia on the root surface by ectotrophic hyphae, conidiogenesis in the degenerated cortex two weeks after planting and the development of conidiophores, that originated from internal hyphae, on the root surfaces. Thick walled sclerotium-like structures were also present on the root surface.

Aggregation of host cytoplasm were of the first host reactions to the presence of the pathogen in or between cells. This was followed by a general loss of structural integrity of the organelles. The mitochondria, being the most resistant organelles, also showed disintegration of membranes and cristas.

An interesting result to infection by the pathogen was the inability of commercial cellulase and pectinase to degrade the cell walls of colonized tissue. The inactivation of enzymes by the host or alteration of the cell wall composition in reaction to the presence of the fungus or its metabolites, could be possible explanations.

The extracted fungus metabolite seemed to be toxic. It significantly inhibited root growth and it had a destructive effect on the ultrastructure of the root cells. Surface administration of the metabolite caused the development of lesions almost similar to those caused by the pathogen during infection.

## LITERATUURLYS

- AIST, J.R. 1976. Cytology of penetration and infection - fungi. (In Pirson, A. & Zimmerman, M.H., eds. Encyclopedia of Plant Physiology. New Series. Vol. 4. Berlin : Springer-Verlag. p. 197 - 221)
- ALDRICH, H.C., GRACEN, V.E., YORK, D., EARLE, E.D. & YODER, O.C. 1977. Ultrastructural effects of Helminthosporium maydis race T toxin on mitochondria of corn roots and protoplast. Tissue and Cell, 9:167 - 177.
- ANDERSON, J.R. 1984. Mondelinge mededeling aan outeur. Potchefstroom.
- ANDERSON, J.R. & SLINGER, J.M. 1975. Europium chelate and fluorescent brightener staining of soil propagules and their photomicrographic counting. I. Methods. Soil Biology and Biochemistry, 7:205 - 209.
- BAL, A.K. 1974. Cellulase. (In Hayat, M.A., red. Electron Microscopy of Enzymes: Principles and Methods, Vol. 3. New York : Van Nostrand Reinhold. p. 68 - 76.)
- BATEMAN, D.F. & BASHAM, H.G. 1976. Degradation of plant cell walls and membranes by microbial enzymes. (In Pirson, A. & Zimmerman, M.H., eds. Encyclopedia of Plant Physiology. New Series. Vol. 4. Berlin : Springer-Verlag. p.316 - 355)
- BATEMAN, D.F. & MILLAR, R.L. 1966. Pectic enzymes in tissue degradation. Annual Review of Phytopathology, 4:119 - 146.
- BHULLAR, B.S. & DALY, J.M. 1975. Light-stimulated toxin production in Helminthosporium maydis race T, cultures. Canadian Journal of Botany, 53:1796 - 1800.
- BISHOP, C.D. & COOPER, R.M. 1983. An ultrastructural study of root invasion in three vascular wilt diseases. Physiological Plant Pathology, 22:15 - 28.
- BLAKER, N.S. & MACDONALD, J.D. 1981. Predisposing effects of soil moisture extremes on the susceptibility of Rhododendron to Phytophthora root and crown rot. Phytopathology, 71:831 - 834.
- BOOTH, C. 1971. Introduction to general methods. (In Booth, C., red. Methods in Microbiology. London : Academic Press. p. 1 - 47.)
- BOWEN, G.D. & ROVIRA, A.D. 1976. Microbial colonization of plant roots. Annual Review of Phytopathology, 14:121 - 144.
- BUWALDA, J.G., ROSS, G.J.S., STRIBLEY, D.P. & TINKER, P.B. 1982. The development of endomycorrhizal root systems. III. The mathematical representation of the spread of vesicular-arbuscular mycorrhizal infections in root systems. New Phytologist, 91:669 - 682.
- CALONGE, F.D., FIELDING, A.H., BYRDE, R.J.W. & AKINREFON, O.A. 1969. Changes in ultrastructure following fungal invasion and the possible relevance of extracellular enzymes. Journal of Experimental Botany, 20:350 - 357.
- CAMPBELL, R. & DREW, M.C. 1983. Electron microscopy of gas space

- (aerenchyma) formation in adventitious roots of Zea mays L. subjected to oxygen shortage. Planta, 157:350 - 357.
- CHANDLER, N.B. & SCHOENWOLF, G.C. 1983. Wrinkle-free plastic sections for light microscopy. Stain Technology, 58:238 - 240.
- COETZEE, H. 1982. Plantkundige mikrotegniek. (Ongepubliseer)
- COMSTOCK, J.C. & SCHEFFER, R.P. 1973. Role of host-selective toxin in colonization of corn leaves by Helminthosporium carbonum. Phytopathology, 63:24 - 29.
- COOPER, R.M. 1981. Pathogen-induced changes in host ultrastructure. (In Staples, R.C. & Toenniessen, G.H., eds. Plant disease control. Resistance and susceptibility. New York : John Wiley. p. 105 - 142)
- CURL, E.A. 1982. The rhizosphere: relation to pathogen behavior and root disease. Plant Disease, 66:624 - 630.
- DALY, J.M. 1981. Mechanisms of action. (In Durbin, R.D., red. Toxins in Plant Disease. New York : Academic Press. p. 331 - 394.)
- DANIELS, B.A. 1983. Elimination of Fusarium moniliforme from corn seed. Plant Disease, 67:609 - 611.
- DREW, M.C., JACKSON, M.B. & GIFFARD, S. 1979. Ethylene-promoted adventitious rooting and development of cortical air spaces (aerenchyma) in roots may be adaptive responses to flooding in Zea mays L. Planta, 147, 83 - 88.
- DU TOIT, J.J. 1966. Wortelvrot van mielies. Pretoria : UP. (Proefskrif - D.Sc. Agric.) 260 p.
- DU TOIT, J.J. 1969. Root rot of young maize plants and certain mycological factors pertaining to the soil. Phytophylactica, 1:51 - 56.
- EMMETT, R.W. & PARBERY, D.G. 1975. Appressoria. Annual Review of Phytopathology, 13:147 - 167.
- GARRETT, S.D. 1979. The soil-root interface in relation to disease. (In Harley, J.L. & Scott Russell, R., eds. The soil-root interface. Proceedings of an international symposium held in Oxford, England, March 28 to 31, 1978. London : Academic Press. p. 301 - 313.)
- GLIMELIUS, K. 1984. High growth rate and regeneration capacity of hypocotyl protoplasts in some Brassicaceae. Physiologia Plantarum, 61:38 - 44.
- GOODMAN, R.N. 1972. Phytotoxin-induced ultrastructural modifications of plant cells. (In Wood, R.K.S., Ballio, A. & Graniti, A., eds. Phytotoxins in Plant Disease : Proceedings of the NATO Advanced Study Institute, Pugnochiuso, Italy, June 1970. London : Academic Press. p. 311 - 329.)
- GOODMAN, R.N., KIRALY, Z. & ZAITLIN, M. 1967. The biochemistry and physiology of infectious plant disease. Princeton, New Jersey : Van Nostrand. 331 p.
- GROBBELAAR, W.P. 1963. Response of young maize plants to root temperature. Mededelingen van de landbouwhogeschool te

Wageningen, Nederland, 63:1 - 71.

- HAGEMAN, R.H., FLESHER, D., WABOL, J.J. & STORCK, D.H. 1961. An improved nutrient culture technique for growing corn under greenhouse conditions. Agronomy Journal, 53:175 - 180.
- HAMMERSCHMIDT, R. 1984. Rapid deposition of lignin in potato tuber tissue as a response to fungi non-pathogenic on potato. Physiological Plant Pathology, 24:33 - 42.
- HANCHEY, P. 1981. Ultrastructural effects. (In Durbin, R.D., red. Toxins in Plant Disease. New York : Academic Press. p. 449 - 475.)
- HANCHEY, P. & WHEELER H. 1971. Pathological changes in ultrastructure: Tobacco roots infected with Phytophthora parasitica var. nicotianae. Phytopathology, 61:33 - 39.
- HARVEY, I.C. 1977. Studies of the infection of lupin leaves by Pleiochaeta setosa. Canadian Journal of Botany, 55:1261 - 1275.
- HAYAT, M.A. 1981. Fixation for electron microscopy. New York : Academic Press. 473 p.
- HISLOP, E.C. & PITT, D. 1976. Sub-cellular organization in host-parasite interactions. (In Pirson, A. & Zimmerman, M.H., reds. Encyclopedia of Plant Physiology. New Series. Vol. 4. Physiological Plant Pathology. Berlin : Springer-Verlag. p. 389 - 412.)
- JOHNEN, B.G. 1978. Rhizosphere microorganisms and roots stained with europium chelate and fluorescent brightener. Soil Biology and Biochemistry, 10:495 - 502.
- JONKER, E.G.Z. 1967. Maize root rot. Pretoria : UP. (Verhandeling - M.Sc. Agric.) 85p.
- JONKER, E.G.Z. & POTGIETER, H.J. 1970. Infektiwiteit en ensieme van Helminthosporium pedicellatum Henry. Handeling van die agtste jaarkongres van die Suid Afrikaanse Vereniging vir Plantsiektekunde en Mikrobiologie. (Ongepubliseer)
- JONES, D.B. 1981. The ultraplanning technique for SEM specimen preparation. Scanning Electron Microscopy, 2:77 - 81.
- KINDEN, D.A. & BROWN, M.F. 1975. Technique for scanning electron microscopy of fungal structures within plant cells. Phytopathology, 65:74 - 76.
- KUROSAKI, F., AMIN, M. & NISHI, A. 1986. Induction of phytoalexin production and the accumulation of phenolic compounds in cultured carrot cells. Physiological and Molecular Plant Pathology, 28:359 - 370.
- LEONARD, K.J. & SUGGS, E.G. 1974. Setosphaeria prolata, the ascigerous state of Exserohilum prolatum. Mycologia, 66:281 - 297.
- LUKE, H.H. & GRACEN, V.E. 1972. Helminthosporium toxins. (In Kadis, S., Ciegler, A. & Ajl, S.J., reds. Microbial Toxins. New York : Academic Press. p. 139 - 168.)
- MATHRE, D.E. 1969. Physiology of thick-walled spores of soil-

- borne plant pathogenic fungi. I. Respiration and germination of Helminthosporium sativum and H. pedicellatum spores. Canadian Journal of Botany, 47:1513 - 1520.
- MILLER, R.E. 1964. A root rot complex of field corn: symptomatology, sequence of fungi involved and the effect of corn root exudate on these fungi. Dissertation Abstracts, 24:3921.
- MOUNT, M.S. 1978. Tissue disintegrated. (In Horsfall, J.G. & Cowling, E.B., eds. Plant Disease. An Advanced Treatise. Vol. 3. New York : Academic Press. p.279 - 297)
- MURRAY, D.I.L. 1982. Penetration of barley root and coleoptile surfaces by Rhizoctonia solani. Transactions of the British Mycological Society, 79(2):354 - 360.
- MURRAY, G.M. & MAXWELL, D.P. 1975. Penetration of Zea mays by Helminthosporium carbonum. Canadian Journal of Botany, 53:2872 - 2883.
- NAGELE, R.G., DOANE, K.J., LEE, H., WILSON, F.J. & ROISEN, F.J. 1984. A method for exposing the internal anatomy of small and delicate tissues for correlated SEM/TEM studies using polyethylene glycol embedding. Journal of Microscopy, 133:177 - 183.
- NELSON, R.R. 1965. The perfect stage of Helminthosporium pedicellatum. Mycologia, 57:665 - 668.
- PARK, P., NISHIMURA, S., KOHMOTO, K. & OTANI, H. 1981. Comparative effects of host-specific toxins from four pathotypes of Alternaria alternata on the ultrastructure of host cells. Annals of the Phytopathological Society of Japan, 47:488 - 500.
- PATIL, S.S. & DIMOND, A.E. 1967. Inhibition of Verticillium albo-atrum polygalacturonase by oxidation products of polyphenols. Phytopathology, 57:492 - 496.
- PERRY, J.W. & EVERT, R.F. 1983. Histopathology of Verticillium dahliae within mature roots of Russet Burbank potatoes. Canadian Journal of Botany, 61:3405 - 3421.
- PHILLIPS, J.M. & HAYMAN, D.S. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. Transactions of the British Mycological Society, 55:158 - 160.
- PRINGLE, R.B. & SCHEFFER, R.P. 1963. Purification of the selective toxin of Periconia circinata. Phytopathology, 53:785 - 787.
- PRINGLE, R.B. & SCHEFFER, R.P. 1967. Isolation of the host-specific toxin and a related substance with nonspecific toxicity from Helminthosporium carbonum. Phytopathology, 57:1169 - 1172.
- RAO, B., SCHMITTANNER, A.F., CADWELL, R. & ELLETT, C.W. 1978. Prevalence and virulence of Pythium species associated with root rot of corn in poorly drained soil. Phytopathology, 68:1557 - 1563.
- REYNOLDS, E.S. 1963. The use of lead citrate at high pH as an

- electron-opaque stain in electron microscopy. Journal of Cell Biology, 17:208 - 212.
- ROVIRA, A.D. 1969. Plant root exudates. The Botanical Review, 35:35 - 57.
- RUDOLPH, K. 1976. Non-specific toxins. (In Pirson, A. & Zimmerman, M.H., eds. Encyclopedia of Plant Physiology. New Series. Vol. 4. Physiological Plant Pathology. Berlin : Springer-Verlag. p. 270 - 315.)
- RUPPEL, E.G. 1973. Histopathology of resistant and susceptible sugar beet roots inoculated with Rhizoctonia solani. Phytopathology, 63:123 - 126.
- SCHEFFER, R.P. & BRIGGS, S.P. 1981. A perspective of toxin studies in plant pathology. (In Durbin, R.D., red. Toxins in Plant Disease. New York : Academic Press. p. 1 - 20.)
- SCHEFFER, R.P. & LIVINGSTON, R.S. 1984. Host-selective toxins and their role in plant disease. Science, 223:17 - 21.
- SCHEFFER, R.P. & YODER, O.C. 1972. Host-specific toxins and selective toxicity. (In Wood, R.K.S., Ballio, A. & Graniti, A., eds. Phytotoxins in Plant Disease : Proceedings of the NATO Advanced Study Institute, Pugnochiuso, Italy, June 1970. London : Academic Press. p. 251 - 272.)
- SCHOENEWEISS, D.F. 1975. Predisposition, stress, and plant disease. Annual Review of Phytopathology, 13:193 - 211.
- SCHÖNBECK, F. & SCHLÖSSER, E. 1976. Preformed substances as potential protectants. (In Pirson, A. & Zimmerman, M.H., eds. Encyclopedia of Plant Physiology. New Series. Vol. 4. Physiological Plant Pathology. Berlin : Springer-Verlag. p. 653 - 678.)
- SCHROTH, M.N. & HILDEBRAND, D.C. 1964. Influence of plant exudates on root-infecting fungi. Annual Review of Phytopathology, 2:101 - 132.
- SHEPHERD, R.J., BUTLER, E.E. & HALL, D.H. 1967. Occurrence of a root rot disease of corn caused by Helminthosporium pedicellatum. Phytopathology, 57:52 - 56.
- SHEPHERD, R.J., HALL, D.H. & PENDERY, W.E. 1962. A root rot of corn caused by Helminthosporium pedicellatum. Phytopathology, 52:752.
- SIVANESAN, A. 1987. Graminicolous species of Bipolaris, Curvularia, Drechslera, Exserohilum and their teleomorphs. Mycological Papers, Nr. 158. 261 p.
- SHOEMAKER, R.A. 1959. Nomenclature of Drechslera and Bipolaris, grass parasites segregated from 'Helminthosporium'. Canadian Journal of Botany, 37:879 - 887.
- SONDERHOUSEN, E. & BOOTHROYD, C.W. 1965. Penetration of corn roots by Helminthosporium pedicellatum. Phytopathology, 55:1285.
- STEINKAMP, M.P., MARTIN, S.S., HOEFERT, L.L. & RUPPEL, E.G. 1981. Ultrastructure of lesions produced in leaves of Beta vulgaris by cercosporin, a toxin from Cercospora beticola.

Phytopathology, 71:1272 - 1281.

- STROBEL, G.A. 1974. Phytotoxins produced by plant parasites. Annual Review of Plant Physiology, 25:541 - 566.
- STROBEL, G.A. 1982. Phytotoxins. Annual Review of Biochemistry, 51:309 - 333.
- SUTTON, D.C. & DEVERALL, B.J. 1983. Studies on infection of bean (Phaseolus vulgaris) and soybean (Glyxine max) by ascospores of Sclerotinia sclerotiorum. Plant Pathology, 32:251 - 261.
- TVEIT, M. 1956. Pathogenicity of species of Helminthosporium from Brazilian oats. Phytopathology, 46:45 - 48.
- VANCE, C.P., KIRK, T.K. & SHERWOOD, R.T. 1980. Lignification as a mechanism of disease resistance. Annual Review of Phytopathology, 18:259 - 288.
- WHITE, G.A. & TANIGUCHI, E. 1972. The mode of action of helminthosporal. II. Effect on the permeability of plant cell membranes. Canadian Journal of Botany, 50:1415 - 1420.
- WHEELER, H. 1978. Disease alterations in permeability and membranes. (In Horsfall, J.G. & Cowling, E.B., eds. Plant Disease. An Advanced Treatise. Vol. 3. New York : Academic Press. p. 327 - 347)
- WHEELER, H. 1981. Role in pathogenesis. (In Durbin, R.D., red. Toxins in Plant Disease. New York : Academic Press. p. 477 - 494.)
- WOOD, R.K.S. 1972. The development of lesions in plant disease. Indian Phytopathology, 25:17 - 28.
- WOLOSEWICK, J.J. 1980. The application of polyethylene glycol (PEG) to electron microscopy. The Journal of Cell Biology, 86(2):675 - 681.
- WYNN, W.K. & STAPLES, R.C. 1981. Tropisms of fungi in host recognition. (In Staples, R.C. & Toenniessen, G.H., eds. Plant disease control. Resistance and susceptibility. New York : John Wiley. p.45 - 67.)
- YODER, O.C. 1972. Host-specific toxins as determinants of successful colonization by fungi. (In Wood, R.K.S., Ballio, A. & Graniti, A., eds. Phytotoxins in Plant Disease : Proceedings of the NATO Advanced Study Institute, Pugnochiuso, Italy, June 1970. London : Academic Press. p. 457 - 463.)
- YODER, O.C. 1980. Toxins in pathogenesis. Annual Review of Phytopathology, 18:103 - 129.
- ZEYEN, R.J. & BUSHNELL, W.R. 1981. An in-block, light microscope viewing procedure for botanical materials in plastic embedments: with emphasis on location of host cell-microbe encounter sites. Canadian Journal of Botany, 59:397 - 402.