

DIE ULTRASTRUKTURELE HISTOPATOLOGIE VAN DIE INFEKSIË VAN MIELIES
DEUR USTILAGO MAYDIS (D.C.) CORDA.

Lynette Pistorius

B.Sc. Honneurs, H.O.D.

Verhandeling voorgelê as gedeeltelike nakoming van die vereistes
vir die graad Magister Scientiae in die Fakulteit
Natuurwetenskappe van die Potchefstroomse Universiteit vir
Christelike Hoër Onderwys.

Leier : Prof. W.J. Jooste

Potchefstroom

November 1991.

ABSTRACT

THE ULTRASTRUCTURAL HISTOPATHOLOGY OF THE INFECTION OF MAIZE BY USTILAGO MAYDIS (D.C.) CORDA.

Although the life cycle of the smut disease caused by Ustilago maydis has been known for a long time, little is known of the ultrastructural histopathology of the host-pathogen relationship.

The aim of this study therefore, was to investigate some aspects of the ultrastructural histopathology of the life cycle of U. maydis. This concerns those processes which take place after germination of the teliospores up to the formation and development of the teliospores in galls in the host.

Germinating teliospores grown on potato dextrose agar were prepared for transmission- and scanning electron microscopical studies. The following sequence of events was observed. During the initial stage of teliospore germination an increase in the size and number of lipid droplets were observed. Concomitant with this, structural changes occurred in the walls of the teliospores.

The host plant was infected with germinating teliospores and the host-pathogen relationship was studied by transmission- and scanning electron microscopy. The sporidia germinate and penetrate meristematic tissue of Z. mays. The hyphae develop intercellularly in the middle lamellae of cell walls as well as intracellularly in the cell cytoplasm. This penetration of the hyphae into the host occurs without any significant damage to the

cells. In the initial stages of gall formation, hypertrophy and hyperplasia were detected. By the use of the polyethylene glycol embedding procedure in SEM studies the development of the teliospores could be seen in the mucilage which accompanies gall formation in the plant tissue. This was followed by the disintegration of the mucilage mass during maturation of the gall. The host epidermis forms an enclosing layer of cells covering the gall which bursts when mature with subsequent the release of the teliospores.

The possible functional changes in the photosynthetic system of the host during the infection cycle was monitored with the chlorophyll fluorescence test. This test allowed the differentiation between susceptible and resistant maize plants, since the photosynthetic system of the susceptible plants showed decreased activity much sooner after infection than that of the resistant plants. The damage to the photosynthetic system was detected before any macroscopic symptoms were visible. A parallel could be drawn between the fluorescence tests and the ultrastructural observations. It was found that the damage to the photosynthetic apparatus occurred in parallel with the anatomical and morphological changes of the chloroplasts.

DANKBETUIGING

Graag wil ek my opregte dank en waardering teenoor die volgende persone en instansies uitspreek vir hulle aandeel in die daarstelling van hierdie verhandeling :

Prof. W.J. Jooste onder wie se leiding hierdie studie aangevoer is. Ek dank u vir u belangstelling, begrip, advies en geduld veral tydens die skryf van die verhandeling.

Departement Plantwetenskappe, P.U. vir C.H.O., vir die daarstelling van die fasiliteite om die navorsing te doen.

Personeel van die Departement Plantwetenskappe, vir hul belangstelling en aanmoediging om die studie te voltooi.

Prof. G.H.J. Krüger en Mnr. L. van Rensburg vir leiding tydens die chlorofilfluoressensie toetse.

Departement Elektronmikroskopie vir die daarstelling van die fasiliteite om die navorsing te doen.

Dr. L.R. Tiedt vir leiding, hulp, bystand en ondersteuning, in besonder met die beplanning van die elektronmikroskopiese ondersoeke, fotoversorging en die afhandeling van die verhandeling.

Dr. P.J. Pretorius en Mev. W.E. Pretorius vir hulp, bystand en ondersteuning.

Mnr. B. Ubbink en Mnr. K. Bezuidenhout vir die beskikbaarstelling van die Botaniese Tuin se fasiliteite vir die aanplant en vir die versorging van mielieplante.

Mnr. F.P. Alldrich vir die finale uitset en druk van die verhandeling en vir die daarstelling van die fasiliteite van die Laser drukker.

Mev. J.N. Pelzer vir hulp en leiding met die literatuurlys.

Mnr. A.P. Coetzee vir sy belangstelling, onderskraging en aanmoediging tydens die studie.

My ouers en familie vir hul voortdurende belangstelling en aanmoediging.

My vriende vir ondersteuning en aanmoediging.

Aan God al die lof en die eer.

INHOUDSOPGAWE	p.
Abstract	i
Dankbetuiging	iii
1. ALGEMENE INLEIDING	1
2. DIE ULTRASTRUKTUUR VAN KIEMENDE TELIOSPORE VAN <u>USTILAGO MAYDIS</u>	11
2.1. Inleiding	11
2.2. Materiaal en Metodes	12
2.3. Resultate	17
2.4. Bespreking	20
3. 'n ULTRASTRUKTURELE HISTOPATOLOGIESE STUDIE VAN <u>USTILAGO MAYDIS</u> GEINFEKTEERDE GASHEER (<u>ZEА MAYS</u>) WEEFSEL	32
3.1. Inleiding	32
3.2. Materiaal en Metodes	32
3.3. Resultate	35
3.4. Bespreking	42
4. CHLOROFILFLUORESENSIE <u>IN VIVO</u> AS MAATSTAF VAN BESKADIGING IN MIELIEPLANTE GEINFEKTEER MET <u>USTILAGO MAYDIS</u>	47
4.1. Inleiding	47
4.2. Materiaal en Metodes	48
4.3. Resultate en Bespreking	49

5.	GALVORMING VAN <u>USTILAGO</u> <u>MAYDIS</u> IN GEÏNFEKTEERDE MIELIEPLANTE : 'n SKANDEËR ELEKTRONMIKROSKOPIESE ONDERSOEK.	55
5.1.	Inleiding	55
5.2.	Materiaal en Metodes	55
5.3.	Resultate	58
5.4	Bespreking	59
6.	GEVOLGTREKKING	65
7.	LITERATUURLYS	67

HOOFSTUK 1:

Algemene inleiding :

Blaasbrand veroorsaak deur Ustilago maydis (D.C.) Corda is lank reeds bekend aan die mens. Die lewenssiklus van die fungus is sedert 1927 bekend. Tot nog toe is daar egter min bekend oor die ultrastrukturele histopatologie van die patogeen-gasheer verhouding.

Geskiedenis : Die siekte van mielies wat deur U. maydis veroorsaak word is waarskynlik na die suide van Europa deur vroeëre Spaanse ontdekkingsreisigers versprei. Dit is in Europa in 1750 aangeteken en in die Verenigde State in 1822 toe Schweinitz sy eerste lys van Amerikaanse fungusse gepubliseer het (Christensen, 1963).

Verskeie menings het gevolg oor die botaniese naam vir die fungus. Volgens Ainsworth (1965) is die fungus in die verlede as volg benaam :

- Ustilago maydis (D.C.) Corda,
- ≡ Uredo maydis de Candolle, 1815.
- = Uredo zeae Schweinitz, 1822.
- ≡ Ustilago zeae (Schw.) Unger, 1833.
- = Ustilago zeae-mays Magnus, 1895.

Stevenson en Johnson het in 1944 bewys dat Ustilago maydis (D.C.) Corda die korrekte binomiaal is, volgens die Internasionale Reëls van Botaniese Nomenklatuur. Hierdie naam word huidiglik deur die meeste plantpatoloë gebruik (Fisher en Holton, 1957).

Volgens Moore (1972) behoort die Ustilaginales waaronder U. maydis geklassifiseer word, in 'n afsonderlike onderafdeling tussen die Ascomycotina en die Basidiomycotina, naamlik die Ustomycota geplaas te word. Die benaming "ustilaginaceous" fungusse, is tradisioneel sinoniem met die brandfungusse. Alhoewel die fungusse in die algemeen saam met die Uredinales in dieselfde klas, Teliomycetes gegroepeer word kom dit slegs oppervlakkig daarmee ooreen. Die weerstandbiedende sel wat Moore (1972) die ustosporium noem is volgens hom nie 'n teliosporium nie en die een of meer ontkiemingshifse produseer somatiese sporidiums en nie sporidiums wat na meiose gevorm het nie. Ultrastrukturele ondersoek van 'n paar Ustilago spesies het getoon dat die septums ooreenstem met die van basidiomycetes, maar die doliporie/parentosoom kompleks is afwesig (Moore, 1972).

Terminologie : Die term teliosporium is in die verlede op verskillende wyses gedefinieer deur verskeie mikoloë en plantpatoloë. Sommige persone gebruik eerder die term chlamidosporium as teliosporium wanneer die spore van U. maydis beskryf word. Volgens Fisher & Holton (1957) is die gebruik van die term chlamidosporium verkeerd, aangesien 'n chlamidosporium 'n ongeslagtelike spoor is. Ainsworth (1971) definieer 'n chlamidosporium as 'n dikwandige, nie-afvallende, interkalêr of terminale ongeslagtelike spoor wat holoblasties gevorm word. In teenstelling definieer hy 'n teliosporium (teleutosporium) as 'n spoor van die Uredinales wat oorsprong aan 'n basidium gee. Die laasgenoemde beskrywing pas eerder by die teliosporium van U. maydis as die beskrywing van die chlamidosporium. Volgens Roberts

en Boothroyd (1972), is 'n teliospoor 'n rustende spoor wat kiem om oorsprong te gee aan 'n promiselium waarin meiose voorkom. Laasgenoemde beskrywing is tiperend van die oorlewingspoor van U. maydis wat in hierdie studie ondersoek is.

Volgens Moore (1972) is die sigotiese sel van die Ustilaginales beskryf as 'n geënsisteerde interkalêre-/ of terminale sel van die dikariotiese miselium. Na hierdie sel verwys verskeie outeurs as 'n chlamidospoor (reflekteer die hife oorsprong), 'n teliospoor ('n vals analogie met die Uredinales) of 'n brand- of melanospoor (diegene wat die ander twee terme onbevredigend vind) (Moore, 1972). Hy het voorgestel dat die weerstandbiedende spore van die Ustilaginales benaam moet word as ustospore.

In 1847 het Tulasne die kiembuis van die teliospoor die **promiselium** genoem (Christensen, 1963). Ainsworth (1971) definieer die promiselium as die basidium van die Uredinales en die Ustilaginales waarop die promiselium spore, naamlik die sporidiums gedra word.

Dit bring ons onwillekeurig by die terminologie van die **basidium**. Ainsworth (1971) definieer 'n basidium as die orgaan van die Basidiomycetes wat basidiospore dra nadat kariogamie en meiose plaasgevind het. Ainsworth (1971) beskryf verskillende basidiumtipes wat voorkom en die beskrywing van 'n fragmobasidium, naamlik dat dit 'n basidium is waar die metabasidium normaalweg verdeel word deur horisontale primêre septums, pas by die beskrywing van die basidium in hierdie ondersoek.

Uit bogenoemde kan afgelei word dat die gebruik van die terme basidium en promiselium verwarring kan skep, maar in hierdie ondersoek word die term promiselium gebruik voor die septums gevorm is en die term basidium nadat die septums gevorm is.

Die primêre spore wat op die basidium gevorm word, is basidiospore genoem, maar soms het Tulasne na laasgenoemde ook as sporidiums verwys (Christensen, 1963). Brefeld het dit in 1895 beskryf as konidiums, aangesien dit voortplant deur knopvorming soos gisselle (Christensen, 1963). Tydens die kieming, beweeg die nukleus in die promiselium in en meiose vind plaas (Fisher en Holton, 1957). 'n Onbepaalde en varierende getal spore word op die basidium gevorm (Fisher en Holton, 1957). In al die spore is dogternukleuse teenwoordig (Moore, 1972). In hierdie ondersoek word gebruik gemaak van die term sporidium.

Lewenssiklus : U. maydis veroorsaak galle en ander morfologiese veranderinge aan mielieplante. Na infeksie van die gasheer ontwikkel daar blaasagtige strukture (galle) op enige bogrondse deel van die gasheerplant, waar die patogeen meristematische weefsel binnegedring het. Soms kan galle selfs op die stutwortels van mielies vorm, maar op die ondergrondse wortels is galle van U. maydis nog nooit gevind nie (Christensen, 1963; Mills, 1978). Jong galle word bedek met 'n silwerkleurige "membraan"/omhulsel wat swart verkleur wanneer die galle volwasse word. Teliospore word in massas geproduseer in hierdie brandgalle op. By rypheid, skeur die galmembraan oop en die droë poeieragtige teliospore word vrygestel (Mills, 1978). Die spore oorwinter in die grond of

in galle op plantreste. Die galle is hidrofobies en daarom kan die spore droog bly gedurende die lente, al lê dit op klam grond (Christensen, 1963).

Die graad van ernstigheid van siekte ontwikkeling is in 'n groot mate afhanklik van die deel van die plant waar die galle voorkom, die vatbaarheid van die gasheer en die virulensie van die inokulum van die fungus (Christensen, 1963).

Jong mielieplante is baie vatbaar vir blaasbrand. Infeksie lei meestal tot hipertrofie en hiperplasia deur galvorming op die stingels en blare. Dit word gevolg deur die degenerasie van die aangetaste weefsel en as die kop of pluim aangetas word veroorsaak dit oesverliese (Christensen, 1963).

In die lewensiklus van U. maydis kan drie nukleusfases onderskei word, naamlik die diplofase, die haplofase en die dikariofase. Hierdie drie fases kom onderskeidelik voor in die teliospoor, promiselium/basidium en in die hifes in die gasheer. Die diplofase begin wanneer die dikariofase of parasitiese fase geëindig het. Op hierdie stadium het sekere van die binukleêre hifeselle oorgegaan tot die vorming van teliospore. In die algemeen is die diplofase by alle brandfungusse die tydperk wat die oorlewingspoor rustend bly (Fisher en Holton, 1957).

Tydens die haplofase, by die meeste van die Ustilaginales, verdeel die diploïede nukleus wanneer die teliospoor kiem. Tydens kieming van U. maydis teliospore beweeg die diploïede nukleus in die promiselium in en kom tot stilstand min of meer in die middel

van die promiselium waar die eerste deling - 'n mitotiese deling, plaasvind. Nadat die eerste deling plaasgevind het, beweeg die nukleuse in teenoorgestelde rigtings weg van mekaar. Die twee nukleuse ondergaan meiotiese delings om 'n 4-sellige promiselium (basidium) te vorm waarvan elke sel uninukleêr is. Die nukleus in die basale sel kan terug in die teliospoor beweeg. Die nukleuse in die basidiumsele verdeel en een van die twee nukleuse beweeg in die ontwikkelende sporidium in (Fisher en Holton, 1957). Christensen het in 1931 soortgelyke resultate in studies verkry en bevestig dat uninukleêre sporidiums dominant is (Fisher en Holton, 1957). Die proses van nukleusverdeling en sporidiumvorming is soortgelyk aan die in Sorosporium reilianum (Sphacelotheca reiliana) (Hanna, 1929). By U. hordei vind die eerste nukleusdelings in die teliospoor plaas. Slegs een nukleus bly in die spoor agter terwyl die ander in die promiselium in beweeg om sodoende die basidium te vorm. Dit kan as 'n rede aangevoer word, waarom daar soms meer as een promiselium vanaf die teliospoor ontwikkel. Christensen het in 1931 beweer dat daar solopato-geniese lyne by U. maydis voorkom. Dit beteken dat die primêre- en sekondêre sporidiums uninukleêr is. Die haplofase kan dus bepaal word as die fase vanaf spoorkieming waar die nukleus verdeel, tot waar die haploïede nukleus met 'n verenigbare nukleus in aanraking kom en konjugeer (Fisher en Holton, 1957).

Die oorsprong van die dikariofase by U. maydis is varieerend. Rawitscher het in 1912 gespekuleer dat die groei en ontwikkeling van die hife binne die gasheer, die dikariofase is (Fisher en Holton, 1957). Hanna (1929) het voorgestel dat die binukleêre

fase die gevolg van sporidium vereniging kan wees. Bowman (1946) het sporidiumvereniging van U. maydis in kultuur na 15-20 uur waargeneem. Kort nadat vereniging plaasgevind het, verdeel die nukleuse in elke verenigings gameet (sporidium) en 'n dogternukleus beweeg in die kiembuis in. Seldeling word dan voltooi deur selwandneerlegging. Verdere groei van die binukleêre hifes vind plaas deur middel van seldeling wat ook met ander woorde nukleusdeling impliseer. Dus bevat elke sel van die binukleêre hife normaalweg een paar nukleuse (Bowman, 1946).

Die sporidiums kiem in die vogtige toestande wat bestaan by die groeipunte agter die blaarskedes en in die kelk van die gasheer (Fisher en Holton, 1957). Batiashvili en Natsvlisvili het in 1973 gevind dat infeksie van mielies deur U. maydis plaasvind in meristematische- of embrioniese weefsel in die okselknoppe, blaarskedes, vroulike blomme (baard van mieliekop) en individuele blomme van die pluime (Mills, 1978).

Die kiembuise van die sporidiums van U. maydis groei soms oor die huidmondjies en penetreer aangrensende selle (Mills, 1978). Mills (1978) beweer dat van die hifes na infeksie vinnig deur die selwande dring en aansienlik verdik om intrasellulêr te ontwikkel terwyl die hifes wat intersellulêr ontwikkel dunner en meer reguit vertoon. Dit stem ooreen met Callow & Ling se bevinding in 1973 dat hifes van U. maydis vertak is en dat beide intra- en intersellulêre hifes in die voedsterplant (Z. mays) voorkom (Mills, 1978).

Na die aanvanklike ontwikkeling staak die groei van die hifes en sterf af, tensy dit in kontak kom en verenig met 'n haploïede hife wat uit 'n sporidium van 'n verenigbare paringstipe ontwikkel het (Christensen, 1963). Na die anastomose vergroot die hife in deursnee en is dit dikarioties. Die hifes ontwikkel gewoonlik intersellulêr in die plantweefsel. Die plantselle wat die hifes omring word tot hipertrofie en hiperplasia gestimuleer en sodoende begin die gal om te ontwikkel (Mills, 1978). Dit vind plaas in die parenchiemselle, gewoonlik naby die vaatweefsel. Die ontwikkeling van die galle kan selfs in die vaatweefsel van die gasheerplant plaasvind (Mills, 1978).

Die selinhoud van die vergrote plantselle, word deur die hifes gebruik vir verdere groei en ontwikkeling, waarna die plantselle verval en doodgaan (Christensen, 1963). Die onvolwasse gal bestaan nou hoofsaaklik uit dikariotiese hifes en plantseloorblyfsels (Mills, 1978).

Die hifes groepeer gaandeweg saam in bondels, sodat die gal wat aanvanklik uit delende plantselle ontstaan het, as gevolg van hiperplasia, mettertyd uit bondels inmeakaargevlegde hifes bestaan. Hierdie dikariotiese hifes produseer die teliospore (Mills, 1978).

Die teliospore kom in bondels in die ontwikkelende galweefsel voor. Die hifes van U. maydis produseer stelselmatig teliospore sodat die volwasse gal hoofsaaklik uit 'n massa teliospore bestaan. Die teliospore kan dikwels na die skeuring van die galmembraan, na rypwording, nog steeds in bondels voorkom (Mills,

1978). In die gasheer eindig die dikariofase gewoonlik met die vorming van die teliospore (Christensen, 1963).

Die produkte van fotosintese van gesonde, ten volle ontwikkelde, aktief fotosinterende mielieblare word getranslokeer na die stam en wortels (Milthorpe & Moorby, 1969). In plante wat deur U. maydis geïnfekteer is, word die patroon van translokasie van voedingstowwe verander, deurdat voedingstowwe hoofsaaklik na die geïnfekteerde gedeeltes/weefsel vervoer word ten koste van ander dele van die plant. Dit vind veral gedurende spoorvorming plaas (Billett & Burnett, 1978b). Dus, wanneer 'n blaar geïnfekteer is, word die vervoer van voedingstowwe uit die blaar verminder en die vanaf ongeïnfekteerde blare verhoog. Min of meer al die voedingstowwe wat in 'n geïnfekteerde blaar is, is gekonsentreer rondom die gal area. Maksimale opeenhoping van voedingstowwe in geïnfekteerde weefsel stem ooreen met die tempo van fungus vermeerdering (Billett & Burnett, 1978b).

Die wortels van 'n geïnfekteerde mielieplant ontvang tot die helfte minder voedingstowwe in 'n 24 uur periode as die wortels van 'n gesonde mielieplant. Dit is die rede waarom daar afname in wortelgroei plaasvind (Billett & Burnett, 1978b).

Die auksieninhoud van U. maydis geïnfekteerde weefsel is hoër as in die ooreenstemmende ongeïnfekteerde areas/weefsel is. Auksiene is waarskynlik betrokke by galvorming. Galvorming word voorafgegaan deur 'n verhoging of 'n toename in die kinienkonsentrasie (Billett & Burnett, 1978b). Auksiene en kiniene kan direk by die vervoer van voedingstowwe na galareas

waar suikers onttrek word betrokke wees. Dit kan ook indirek betrokke wees deur die groei en respirasie van geïnfekteerde weefsel te stimuleer (Billett & Burnett 1978b).

In hierdie ondersoek word gepoog om die ultrastrukturele histopatologiese aspekte van die fungus se lewenssiklus te bestudeer. Dit sluit in die prosesse wat plaasvind na die ontkieming van die teliospoor (oorlewingspoor) tot en met die vorming en volwassewording van die teliospore in die sorus (gal) in die gasheer. Dele van die geïnfekteerde gasheer weefsel sal met behulp van transmissie- en skandeerelektronmikroskopiese en ligmikroskopiese tegnieke bestudeer word.

HOOFSTUK 2.

Die ultrastruktuur van kiemende teliospore van Ustilago maydis.

Inleiding :

Tydens die lewensloop van Ustilago maydis (D.C.) Corda kom daar twee spoorstadiums voor, naamlik die teliospoor wat die rustende- of oorlewingspoor is en die sporidiums wat die gasheer binnedring en infeksie veroorsaak (Fisher & Holton, 1957).

Ultrastukturele ondersoeke van teliospore van Teliomycetes (Ustilaginales en Uredinales) is al uitgevoer, byvoorbeeld van Tilletia caries (Allen et al., 1971), Ustilago hordei (Robb, 1972), Tilletia indica (Gardner et al., 1983), Enthoriza casparyana (Fineran & Fineran, 1984), Ustilago scitaminea (Paine & Hess, 1984). Ramberg & McLaughlin (1980) het aspekte van die ultrastruktuur van die kiemingsproses van die U. maydis teliospore bestudeer. Inligting oor sporidiumontwikkeling by die Ustilaginales is baie vaag. Vroeëre navorsers, Brefeld in 1883, Hitchcock & Norton, 1896, Clinton in 1900 en Stakman in 1914 het volgens Ramberg & McLaughlin (1980) met behulp van ligmikroskopie sekere aspekte van die fungus, naamlik teliospoor morfologie, volwasse basidium morfologie en die posisie en morfologie van die sporidiums waargeneem. Ook het Hanna (1929) en Fisher & Holton (1957) 'n bydrae op hierdie gebied gelewer.

In hierdie deel van die ondersoek word die kieming van die teliospore, die ontwikkeling van die basidium en die sporidiums van U. maydis op ultrastrukturele vlak bestudeer.

Materiaal en Metodes :

Volwasse galle van U. maydis vanaf geïnfecteerde Zea mays plante is by die Instituut vir Graangewasse te Potchefstroom versamel in die 1989/1990 seisoen. Die galle is luggedroog waarna die teliospore uit die galle geskud is. Die teliospore is deur 'n Nylon gaasdoek met 10 µm openinge gesif om sodoende oortollige plantreste te verwyder. Die teliospore is daarna in glasflessies by 4°C geberg.

Die teliospore is vooraf behandel om ongewenste organismes te verwyder. Dit is as volg gedoen : Teliospore is op 'n 10µm Nuclepore membraan in 'n Swinnex-13 filterhouer geplaas en met 10cm³ steriele water met behulp van 'n 10cm³ spuit gewas, daarna met 10cm³ van 'n 3,5% natriumhipochloriet oplossing en weer met steriele water.

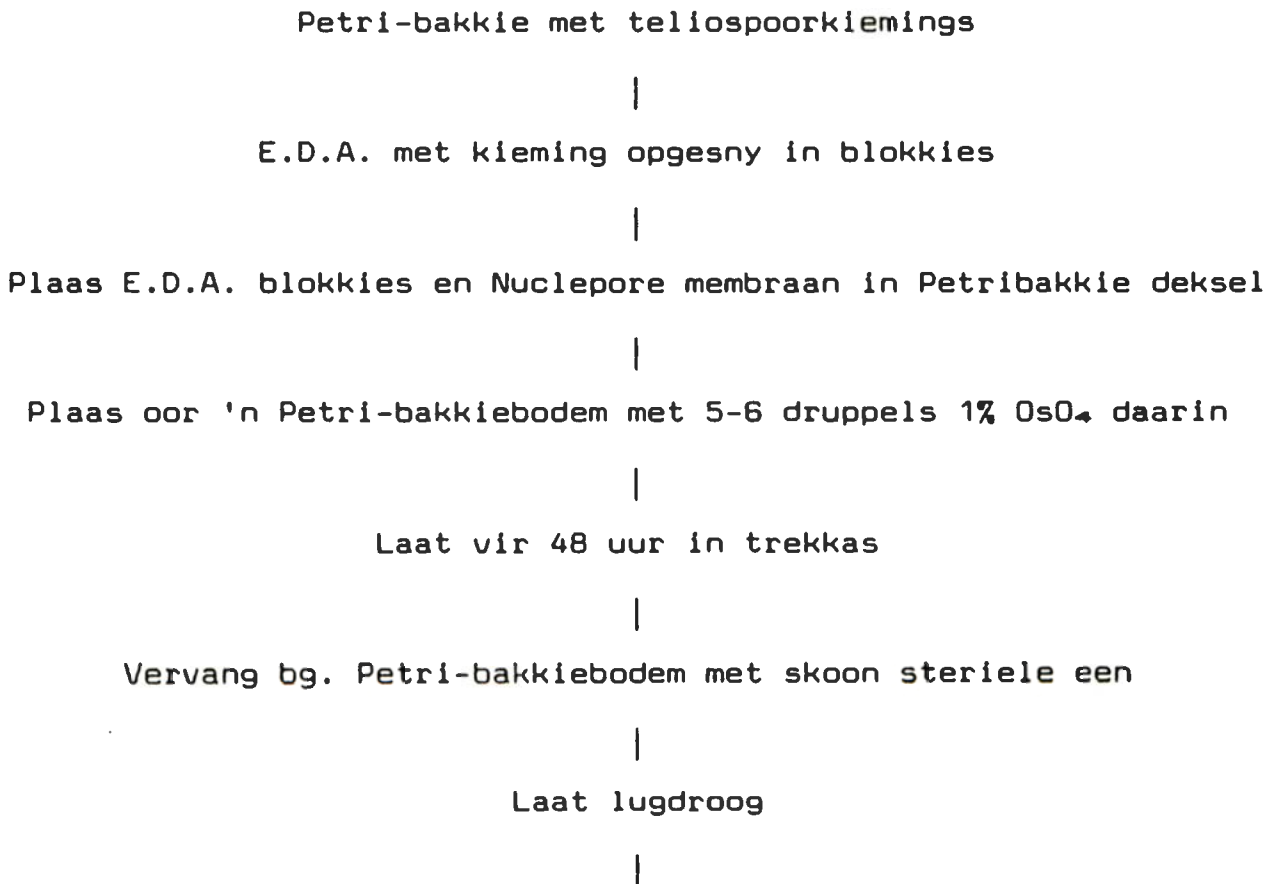
Vir die bestudering van die kieming met behulp van skandeer- en transmissie elektronmikroskopie is die gesuiwerde teliospore op 2% Aartappel Dekstrose Agar (E.D.A.) geplaas, waarby 250mg Penbritin antibiotika en 250 mg Chloromycetin per liter gevoeg is. Die Nuclepore membraan met teliospore daarop is op die oppervlak van die agar geplaas. Die teliospore is met 'n klein hoeveelheid steriele water van die membraan afgespoel en oor die agar versprei. Die spore wat op die Nuclepore membraan agtergebly het, is so gelaat omdat kieming ook hier plaasvind op die membraan. Die laasgenoemde is hoofsaaklik vir skandeer elektronmikroskopiese studies gebruik.

Skandeer elektronmikroskopie (SEM) :

Kweekmetodes vir SEM studies :

Die gesuiwerde teliospore van U. maydis op die agar is in 'n inkubator, by 25°C vir 23 uur geïnkubeer waarna kieming waargeneem is. Blokkies agar (5X5X2 mm) met die kiemende teliospore daarop is uit die E.D.A. gesny en saam met die Nuclepore membraan met 10 µm openinge waarop kieming ook plaasgevind het volgens die tegniek soos in Figuur 2.1, saamgevat voorberei vir elektronmikroskopie.

Figuur 2.1 : Vloeiagram om die SEM voorbereidingsproses vir Osmiumtetroksied-dampfiksering (Tiedt *et al.*, 1987) voor te stel:



Monteer fungusblokkies en Nuclepore membraan op SEM knopies

|

Blitsbedamp met Koolstof (\pm 2 sek.)

|

Bedamp met Goud/Palladium (stroomsterkte : 5mA)

(3 keer vir 3 min. elk met 'n tussen periode van 5 min.)

Die teliospore is met 'n Cambridge Stereoscan 250S Skandeer elektronmikroskoop ondersoek by 'n werkspanning van 10kV.

Kieming van sporidiums op Zea mays blare :

Kiemende teliospore en sporidiums is as inokulum in hierdie ondersoek gebruik. Die kweking van die fungus is reeds onder kweekmetodes vir SEM beskryf (p. 13).

Z. mays plante wat op die twee blaar stadium is, is gebruik. Stukkies van die tweede blaar is in 'n vogkamer, bestaande uit 'n aangeklamde filtreerpapier in 'n petribakkie geplaas. Kiemende teliospore is op die stukkies blaar gedrup en gelaat. Ondersoeke is na 24-, 48- en 72 uur periodes gedoen. Stukkies blaar is in petribakkies geplaas. Die Osmiumtetroksied-damp fikseringstegniek (Tiedt et al., 1987) is as voorbereidingstegniek in hierdie ondersoek gebruik (Fig. 2.1).

Die kieming van die sporidiums op die mielieblare is met 'n Cambridge Stereoscan 250S Skandeer elektronmikroskoop by 'n werkspanning van 10 kV bestudeer.

Transmissie Elektronmikroskopie (TEM) :

Kweekmetodes vir TEM :

Dieselfde prosedure as vir die SEM voorbereiding is hier toegepas. Hier word egter slegs van die agar blokkies waarop die kiemende teliospore voorkom gebruik gemaak en nie van die 10µm Nuclepore membraan nie.

Teliospore wat nie op voedingsmedium geplaas is nie, is ook voorberei. Die spore is slegs op 1,5% wateragar geplaas en dieselfde voorbereidings prosedures is gevolg as by die kiemende teliospore (Fig. 2.2).

Vorbereidingstegnieke vir TEM :

Die voorbereidingsprosedure word in Fig. 2.2 gegee.

Sneë van 0,2 - 0,5µm dikte is met 'n Reichert Ultracut E- of 'n Reichert Austria Om U2 mikrotroom gesny en met 200 maas Cu/Pd roostertjies opgetel. Die sneë is gekleur deur die roostertjies met sneë na onder (Pd kant) op 2% uranielasetaat by 30°C op 'n kolplaat te laat dryf vir 5 minute. Die roostertjies is daarna gespoel in gedistilleerde water en gekleur met loodsitraat (Reynolds, 1963) vir 2 minute deur 'n druppel loodsitraat op te drup en te laat. Die loodsitraat kleuring is by kamertemperatuur gedoen. Na 'n verdere spoel met gedistilleerde water, is die roostertjies ondersoek met 'n Philips CM 10 Transmissie elektronmikroskoop met 'n werkspanning van 80- of 100kV.

Figuur 2.2 : Vloei-diagram van die voorbereidingsprosedure vir TEM
Kiemende teliospore op agar

|
Kiemende teliospore op E.D.A. opgesny in blokkies

|
Blokkies bedek met 1,5% wateragar op voorwerp glasies

|
Weer in blokkies uit 1,5% wateragar gesny

|
Blokkies fikseer met Todd's fikseermiddel (Todd, 1986) vir 1 uur

|
Spoel 3X in buffer vir 10 min.

|
Postfikseer in 1% OsO₄ vir 1 uur

|
Spoel 3X in gedistilleerde water vir 10 min.

|
Kleur met 2% uranielasetaat vir 30 min.

|
Spoel 3X in gedistilleerde water vir 10 min.

|
Dehidreer in 'n aseton reeks vir 15 min. elk

(50%, 75%, 95%, 100%, 100%)

|
2:1 mengsel aseton en hars (Spurr, 1969) tot afgesak, plus 1 uur

|
1:1 mengsel aseton en Spurr-hars tot afgesak, plus 1 uur

|
2X in 100% Spurr-hars tot afgesak, plus 1 uur

Ingebed in Teflongietvorms en gepolimeriseer by 70°C vir 8 uur

Resultate :

Die uitwendige oppervlak van die teliospore van U. maydis is oortrek met stekels (Fig. 2.15). Die wand van die teliospore bestaan uit 3 onderskeibare lae (Fig. 2.3-5). Die buitenste laag (W1) is elektrondig terwyl die middelste (W2)- en binneste laag (W3) relatief elektrondeurlatend is. Indien Fig. 2.3 en Fig. 2.4 vergelyk word, kan 'n verskil in die selwand waargeneem word. In Fig. 2.3 is die teliospore nie deur die voedingsmedium gestimuleer om te kiem nie, terwyl in Fig. 2.4 en 2.5 dit wel gedoen is.

Tydens kieming, skeur die buitenste wand van die teliospore oop (Fig. 2.6-10 & 2.15). Die vorming van die promiselium is die eerste stadium van kieming (Fig. 2.6-8 & 2.15). Die nuut ontwikkelde wande van die promiselium is dun en die oppervlakke vertoon glad (Fig. 2.8 & 2.10). In enkele gevalle is teliospore met twee kiemingshifes waargeneem (Fig. 2.16 & 2.17). In Fig. 2.6 kan 'n moontlike tweede ontwikkelende promiselium waargeneem word. Daar is egter geen aanduiding van hoe die promiseliums georiënteer is ten opsigte van mekaar nie (Fig. 2.16 & 2.17). Daar is ook geen aanduiding van wanneer 'n tweede promiselium kan ontwikkel nie. Gedurende kieming of die vorming van die promiselium is die degenerasie van die buitenste wand duidelik waarneembaar (Fig. 2.6 & 2.9).

Die sitoplasma van die teliospoor wat aanvanklik deel van die promiselium uitmaak, is ryk aan organelle (Fig. 2.6-10). Die opvallende kenmerk van die sitoplasma is egter die aanwesigheid van sferiese lipieddruppels. Die kiemende teliospoor bevat heelwat lipieddruppels van verskillende groottes. Lipieddruppels is ook teenwoordig in die promiselium (Fig. 2.8).

Mitochondrions is teenwoordig in die kiemende teliospoor (Fig. 2.9), maar kom soms verswak voor (Fig. 2.10). Vakuole is ook waargeneem (Fig. 2.6-11). Nukleuse is teenwoordig en slegs een per spoor is waargeneem (Fig. 2.7). Daar kon egter nie vasgestel word op watter tydstip die nukleus verdeel en in die promiselium in beweeg nie. Die verdeling vind waarskynlik voor septum vorming plaas. Ongeïdentifiseerde strukture is waargeneem in die kiemende teliospore (Fig. 2.9). Daar is ook elektrondigte strukture wat hoofsaaklik in die vakuole voorkom (Fig. 2.6-10).

In die promiselium (Fig. 2.8 & 2.15) vind septumvorming (Fig. 2.11 & 2.19) plaas en sodoende word die 4-sellige basidium gevorm. Die volwasse basidium bestaan uit 4 selle waarop 4 primêre sporidiums gevorm word (Fig. 2.18-21). In Fig. 2.12-14 kan waargeneem word hoe 'n primêre sporidium ontwikkel vanuit die basidium. Die sporidiumvorming is holoblasties. In Fig. 2.14 kan

FIGUUR 2.3 - 2.8 : Transmissie elektronmikrograwe van die verskillende ontwikkelings stadiums tydens kieming van die teliospore van Ustilago maydis.

Simbole : Buitenste wandlaag (W1), middelste wandlaag (W2), binneste wandlaag (W3), promiselium (pr), sekondêre promiselium (Spr), lipieddruppels (l), vakuool (v), elektrondigte strukture (e), nukleus (n).

Fig. 2.3 : Teliospoor in rustoestand. Balkie = 1 μ m.

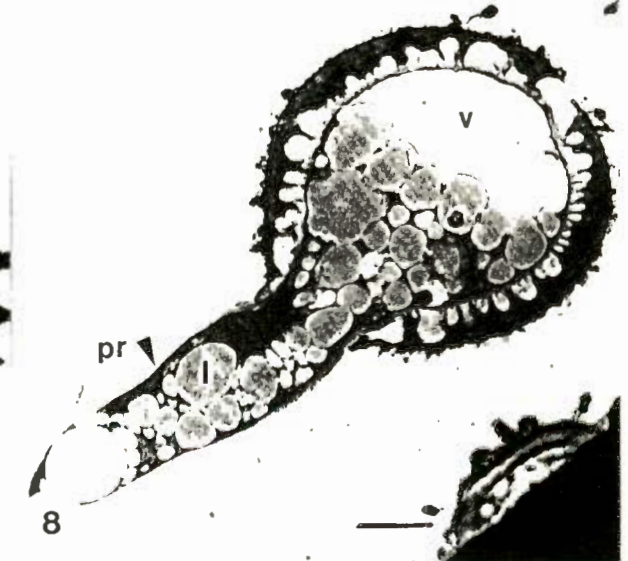
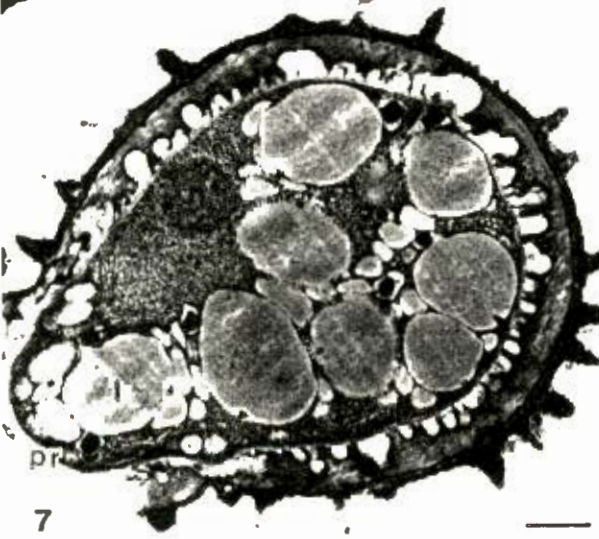
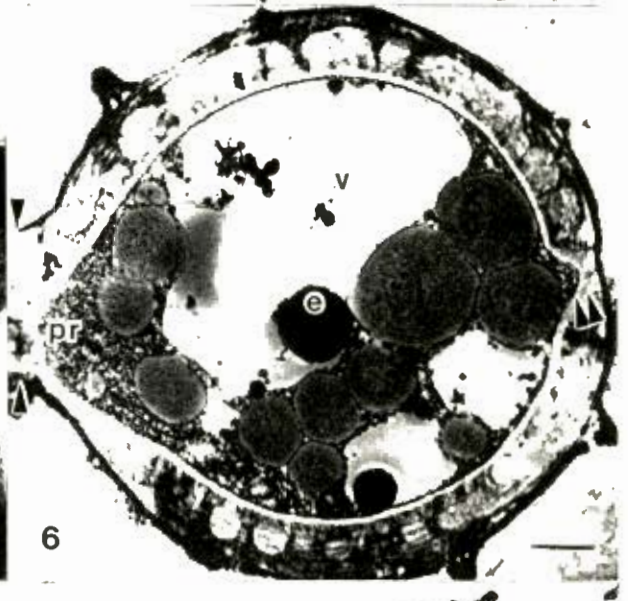
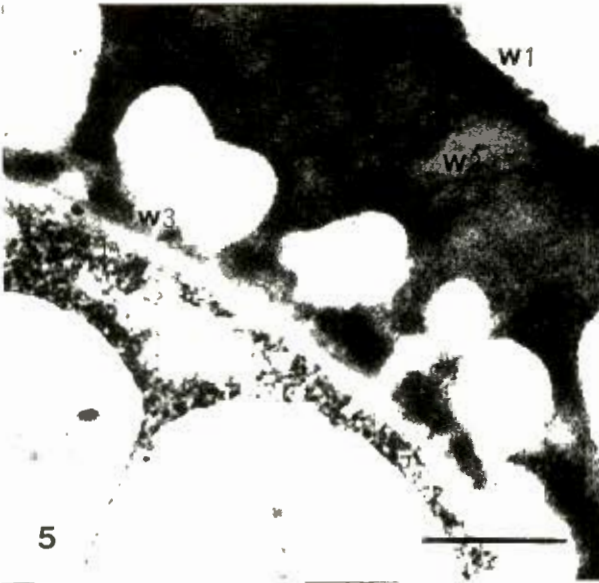
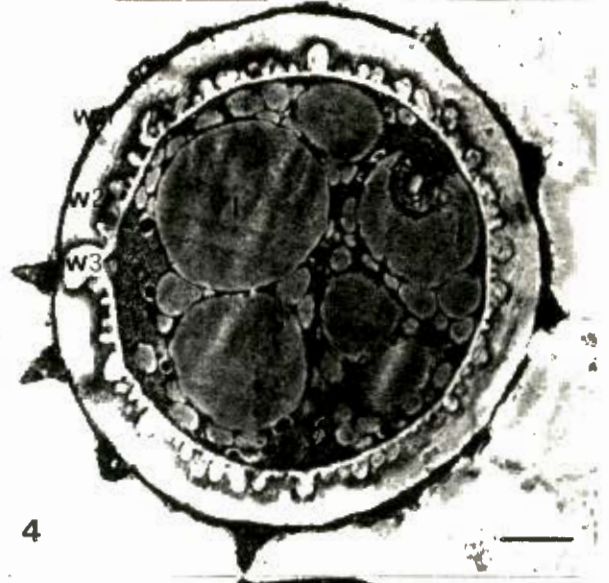
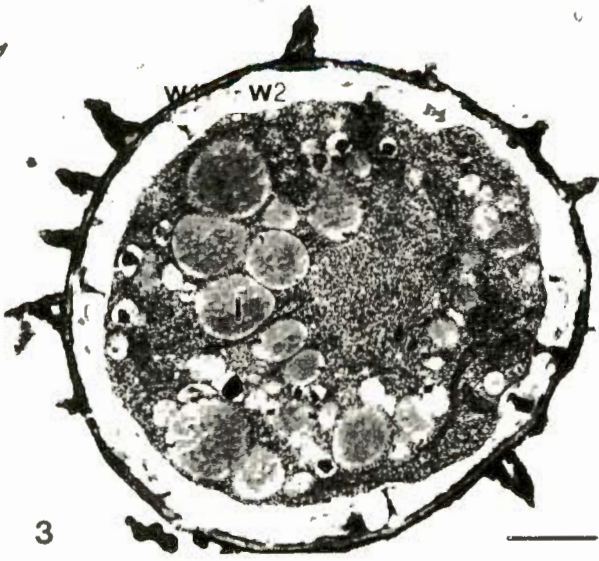
Fig. 2.4 : Teliospoor gestimuleer deur voedingsmedium voor kieming. Balkie = 1 μ m.

Fig. 2.5 : Seksie van teliospoor wand, voor of tydens kieming. Balkie = 0,5 μ m.

Fig. 2.6 : Kieming neem 'n aanvang, en die promiselium skeur die eksogene spoorwand (pyltjies). 'n Sekondêre promiselium (dubbel pyltjie) ook waarneembaar. Balkie = 1 μ m.

Fig. 2.7 : Ontwikkende promiselium. Balkie = 1 μ m.

Fig. 2.8 : Verlengde promiselium. Let daarop dat die wande dun en glad is. Balkie = 2 μ m.



die afsnoering van 'n primêre sporidium deur middel van 'n septum gesien word. Die primêre sporidiums kan na afsnoering van die basidium, verder gisagtig ontwikkel deur knopvorming (Fig. 2.22) om sodoende groot getalle sporidiums te vorm.

In hierdie ondersoek is waargeneem dat die sporidiums kiem deur 'n penetrasiebuis te vorm (Fig. 2.23). Die penetrasie buis wat vorm is slegs in die huidmondjies van die gasheer waargeneem. Geen verskille is waargeneem in die verskillende periodes (24-, 48-, en 72 uur) wat die inokulum op die blaaroppervlak was nie. Soms word 'n afsnoering tussen die eerste en die tweede basidiumsel gevorm (Fig. 2.11 & 2.18). In Fig. 2.20 & 2.21 kan gesien word dat die afsnoering egter tussen die tweede en die derde basidiumsel plaasvind. Die gedeelte wat afsnoer, sterf egter nie af nie en verdere ontwikkeling van beide die gedeeltes kan plaasvind.

Bespreking :

Die ultrastruktuur van Ustilago maydis teliospore is oor die algemeen vergelykbaar met die ultrastruktuur van ander Teliomycetes (Ustilaginales en Uredinales), alhoewel daar betekenisvolle verskille is tussen teliospore van verskillende genusse (Ustilago, Neovossia, Enthoriza, Tilletia) (Fisher & Holton, 1957; Ramberg & McLaughlin, 1980).

FIGUUR 2.9 - 2.14 : Transmissie elektronmikrograwe van die ontwikkeling van die basidium en sporidiums.

Simbole : Basidium (b), lipieddruppels (l), mitochondrion (m), vakuool (v), ongeïdentifiseerde struktuur (o), elektrondigte struktuur (e), sporidium (sp), septum (s).

Fig. 2.9 : Eksogene spoorwand degenereer tydens promiselium en basidium ontwikkeling. Balkie = $2\mu\text{m}$.

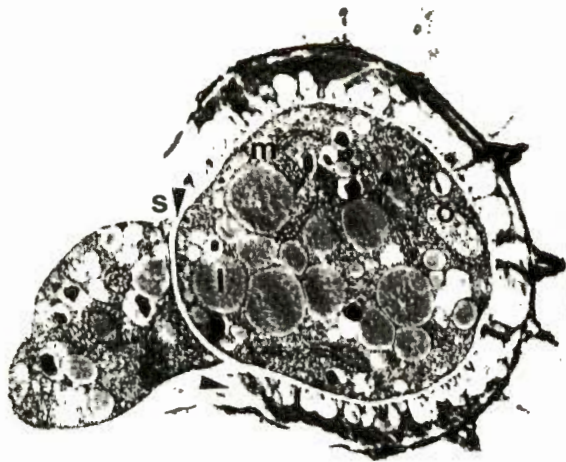
Fig. 2.10 : Ontwikkeling van basidium. Sitoplasma ryk aan organelle. Balkie = $2\mu\text{m}$.

Fig. 2.11 : Septumvorming vind in promiselium plaas om basidium te vorm. Balkie = $0.5\mu\text{m}$.

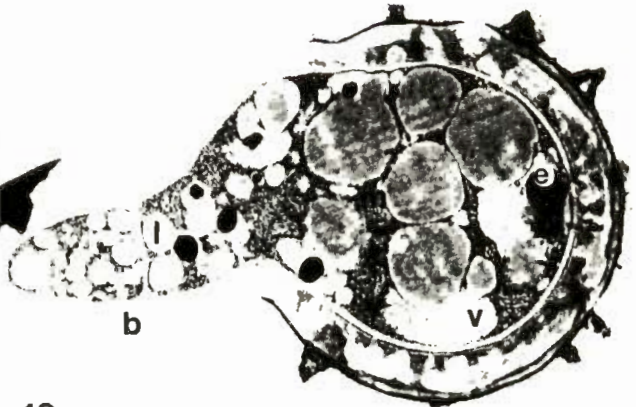
Fig. 2.12 : Primêre sporidium ontwikkel holoblasties (pyltjie). Balkie = $2\mu\text{m}$.

Fig. 2.13 : Primêre sporidium ontwikkel holoblasties (pyltjies). Balkie = $1\mu\text{m}$.

Fig. 2.14 : Afsnoering van die primêre sporidium vanaf die basidium (pyltjies). Balkie = $1\mu\text{m}$.



9



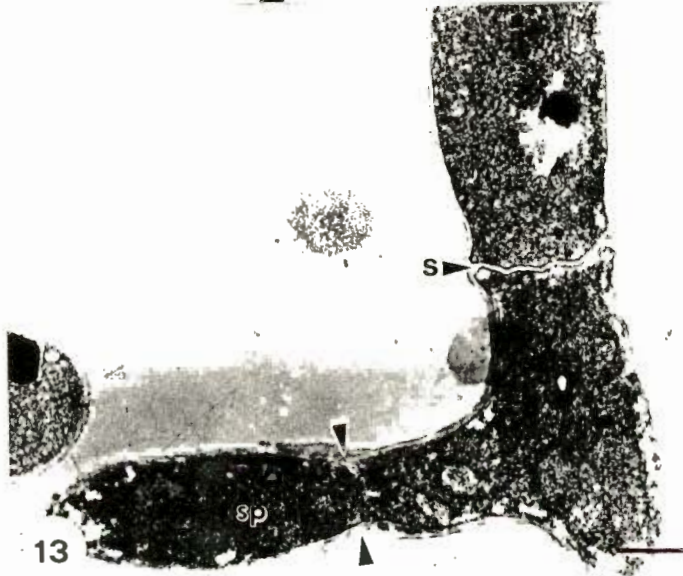
10



11



12



13



14

Spoorwande :

Daar is relatief min studies van teliospore op ultrastrukturele vlak gedoen. Daar is ook min vergelykende studies van die Ustilaginales gedoen en in meeste daarvan is meer eenvoudige tegnieke van gebruik gemaak (Fineran & Fineran, 1984). 'n Uitsondering was egter die studies van Tilletia caries (Allen et al., 1971) en Tilletia indica (Gardner et al., 1983) waar sowel ligmikroskopiese en elektronmikroskopiese (TEM en SEM) ondersoekes ingesluit is.

Die wand van die teliospore van U. maydis bestaan uit 3 onderskeibare lae (Fig. 2.3-5). Die stekels van die teliospore van U. maydis maak deel uit van die buitenste wand (W1) (eksosporium) van die teliospoor (Fig. 2.3, 2.4 & 2.7). Die W1 laag is elektrondig, terwyl die binneste laag relatief elektrondeurlatend is. Dit stem ooreen met die stekels van U. scitaminea (Paine & Hess, 1984). Rustende teliospore van T. caries het 'n geskulpte oppervlak wat 'n geretikuleerde patroon vorm (Allen et al., 1971). Die wandstruktuur van U. maydis verskil van die van T. indica waar die stekels vanuit die binneste laag ontstaan en bedek word deur 'n noupassende (elektrondigte) skede waarin daar soms holtes voorkom (Gardner et al., 1983).

Teliospore van ander Ustilaginales het ten minste twee onderskeibare wandlae (Gardner et al., 1983). Dit wil voorkom of

FIGUUR : 2.15 - 2.20 : Skandeer elektronmikrograwe van die kieming van die teliospoor van Ustilago maydis.

Simbole : Stekels (st), promiselium (pr), sekondêre promiselium (Spr), basidium (b), septum (s), sporidium (sp).

Fig. 2.15 : Uitwendige oppervlak van teliospoor met stekels. Promiselium ontwikkel tydens kieming. Balkie = 5 μ m.

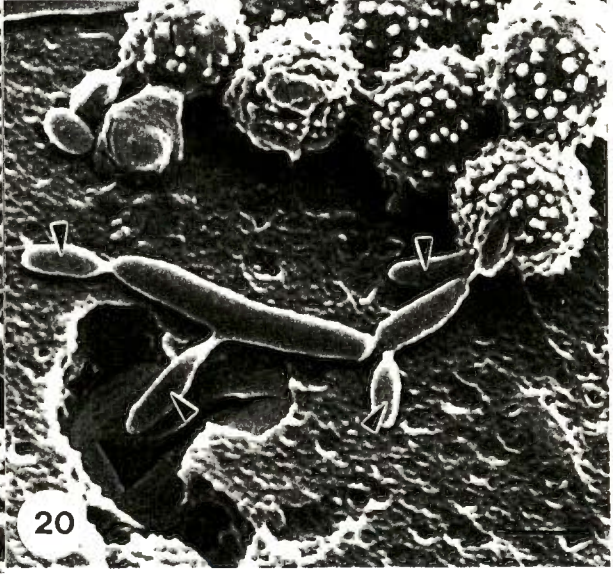
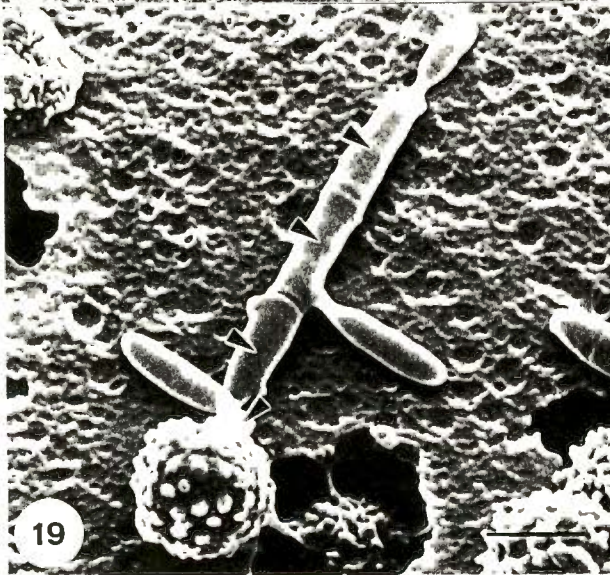
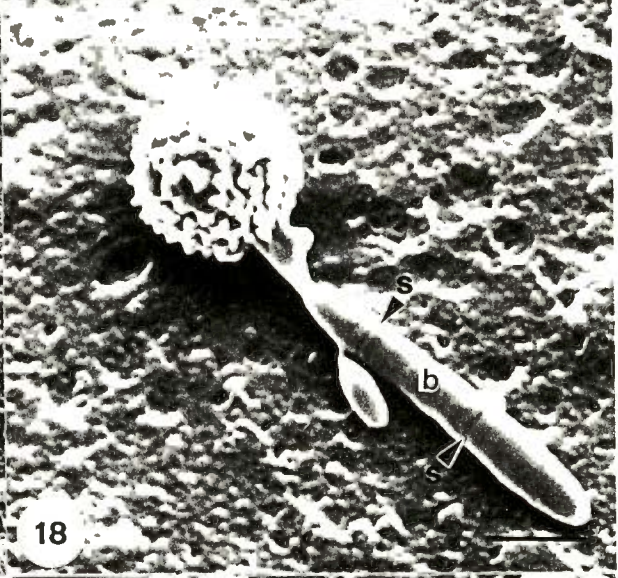
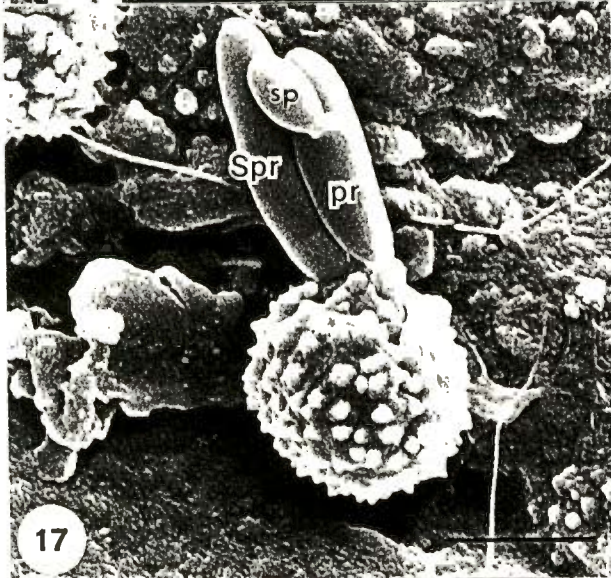
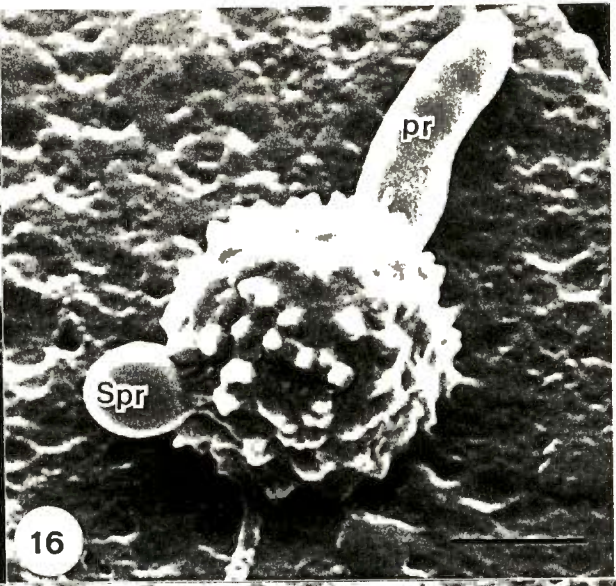
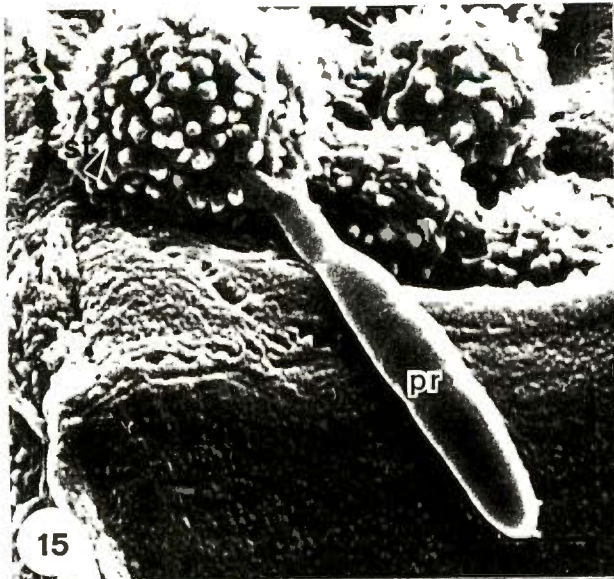
Fig. 2.16 : Ontwikkeling van sekondêre promiselium. Balkie = 4 μ m.

Fig. 2.17 : Ontwikkeling van sekondêre promiselium. Balkie = 5 μ m.

Fig. 2.18 : Septumvorming (pyltjie) vind plaas in promiselium om basidium te vorm. Balkie = 5 μ m.

Fig. 2.19 : Volwasse basidium bestaan uit vier selle (pyltjies) waarop sporidiums ontwikkel. Balkie = 5 μ m.

Fig. 2.20 : Volwasse basidium bestaan uit vier selle met een sporidium ((pyltjies) per sel. Balkie = 5 μ m.



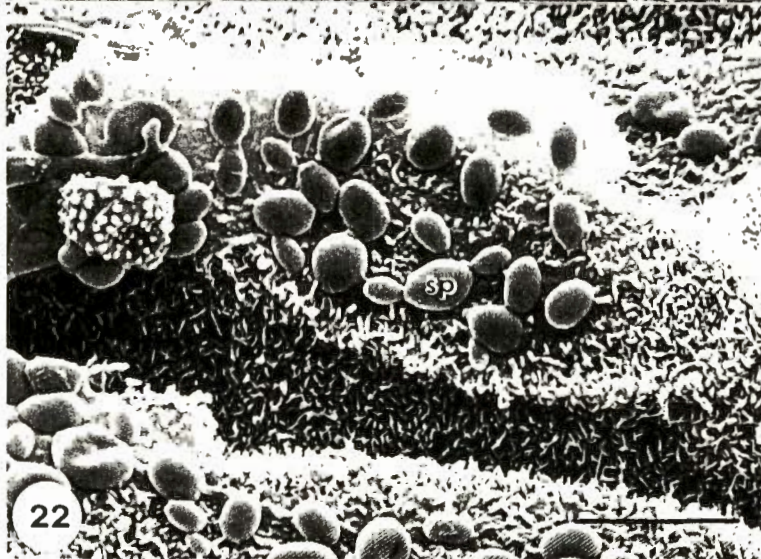
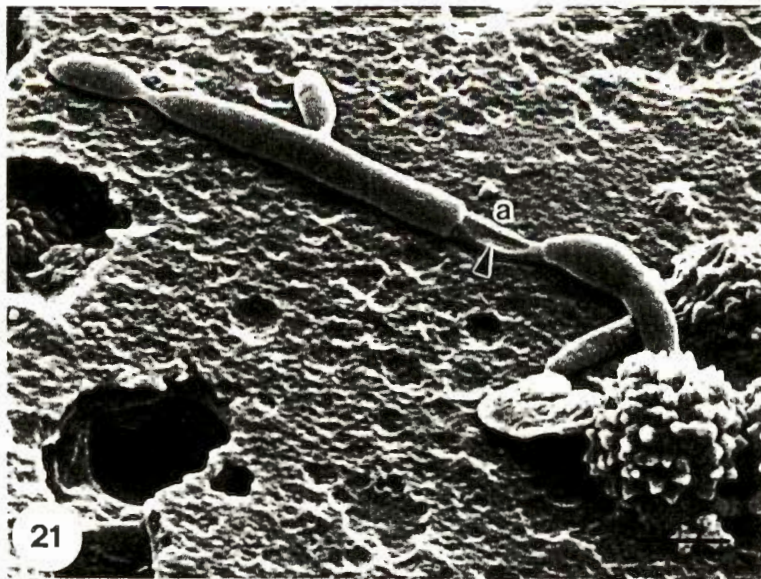
FIGUUR : 2.21 - 2.23 : Skandeer elektronmikrograwe van sporidiums wat gisagtig ontwikkel deur knopvorming en die kieming van sporidiums.

Simbole : Afsnoering (a), sporidium (sp), huidmondjie (hdm), penetrasiehoof (ph).

Fig. 2.21 : Afsnoering vind plaas tussen eerste- en derde basidiumsel. Balkie = 5 μ m.

Fig. 2.22 : Sporidiums ontwikkel gisagtig deur knopvorming. Balkie = 10 μ m.

Fig. 2.23 : Sporidium penetrasiehoof in huidmondjie van gasheer. Balkie = 5 μ m.



die W1 laag van U. maydis en U. scitaminea ooreenstem. Die W1 laag van Enthoriza casparyana stem ook ooreen, met genoemde spesies, alhoewel dit meer vratagtig is. Die W2 en W3 lae van I. caries teliospore (Allen et al., 1971) en die wandlae van U. scitaminea (Paine & Hess, 1984) stem min of meer ooreen.

Wandverandering vind plaas in die teliospore van U. maydis tydens kieming. Die verandering tydens kieming vind in die binneste laag (W2) plaas (Fig. 2.3 & 2.4). In Fig. 2.3 is 'n sneë van 'n rustende teliospore en in Fig. 5 is die teliospore waarskynlik deur die voedingsmedium gestimuleer en kiemgereed. Dit is egter nie duidelik of die struktuurverandering in die vorm van holtes of invaginasies is nie, aangesien dit elektrondeurlatend is (Fig. 2.4 & 2.5). Die struktuurverandering kan die gevolg van ensiemwerking wees. Dit is egter nie duidelik wanneer en waarom die verandering plaasvind nie, maar dit het waarskynlik met die kiemgereedheid van die teliospore te doen. Die holtes in die W2 laag ontstaan waarskynlik waar afbreking van die wand plaasvind, aangesien meer elektrondigte materiaal rondom die holtes aanwesig is (Fig. 2.5). In Fig. 2.5 kan ook waargeneem word dat van die holtes nog aaneenlopend met die plasmamembraan is. Indien perifere ensiemwerking hier plaasvind, kan dit dien om die wand "sag" te maak, waar 'n plek vir die promiselium deur kan groei nadat die W1 laag geskeur het.

Volgens Ramberg & McLaughlin (1980) verander die selwand van die teliospore van U. maydis tydens kieming van fibrillêr na granulêr. Hierdie tekstuurverandering is egter nie in hierdie

studie waargeneem nie. Die tekstuurverandering wat plaasvind volgens Ramberg & McLaughlin (1980) kan as gevolg van afbraak van wandmateriale wees, wat plaasvind deur middel van die ontwikkelende promiselium se kataboliese vermoë.

Ramberg & McLaughlin (1980) dui aan dat by kiemende en rustende teliospore van I. controversa en I. caries 'n gelokaliseerde wanddegenerasie plaasvind wat die vorming van die promiselium voorafgaan. 'n Soortgelyke verskynsel is deur die outeurs by die kieming van U. maydis waargeneem. Hulle het bevind dat daar min of meer 180° teenoor die ontwikkelingspunt van die promiselium 'n evaginasie ontstaan. Dit is ook in hierdie studie waargeneem (Fig.2.6-8). Wat die funksie van hierdie evaginasie is, is onduidelik, maar dit het waarskynlik met die kieming te doen, of dit kan die moontlike ontstaan van 'n sekondêre promiselium aandui. In Fig. 2.16 & 2.17 kan 'n sekondêre promiselium waargeneem word.

Kenmerkend is die eerste elektrondeurlatende laag wat gevorm word om die teliospoorinhoud tydens kiemingstimulering deur beskibare voedingstowwe en vog (Fig. 2.4). Hierdie elektrondeurlatende laagie kom ook voor rondom die teliospoor inhoud tydens die vorming van die promiselium (Fig. 2.6 & 2.9). Hierdie laagie word later meer elektrondig en is aaneenlopend met die promiselium (Fig. 2.8 & 2.10). Dit kan 'n moontlike bewys wees dat die inhoud van die teliospoor in die vorm van 'n geënsisteerde promiselium is, waar laasgenoemde se selwand aanvanklik begin ontwikkel vanuit die teliospoorwand.

Paine & Hess (1984) het waargeneem dat die membrane van meeste teliospore van Ustilaginales invaginasies toon in die membrane. Dit is waargeneem by teliospore wat deur middel van vries-etsing voorberei is. Die invaginasies wat voorkom in die spoormembrane is egter nie teenwoordig in membrane van die kiembuise/hifes nie (Paine & Hess, 1984).

Membraan invaginasies kom voor by rustende teliospore van U. scitaminea, maar is moeilik onderskeibaar of afwesig by die membrane van die kiemende teliospore (Paine & Hess, 1984). Die teliospore van U. maydis is nie in hierdie studie deur middel van vries-etsing voorberei nie, maar membraan invaginasies is ook nie in die rustende of die kiemende teliospore wat deur middel van TEM studies gedoen is, waargeneem nie.

Organelle :

Die organelle van U. maydis teliospore is soortgelyk aan die organelle van ander Ustilaginales. Mitochondrions is teenwoordig, maar is oor die algemeen gereduseer soos waargeneem kan word in Fig.2.9. Dit kan op lae metaboliese aktiwiteit dui. Verswakte mitochondrions is 'n algemene verskynsel by U. scitaminea (Paine & Hess, 1984) en E. casparyana (Fineran & Fineran, 1984).

Volgens Ramberg & McLaughlin (1980) kom growwe endoplasmiese retikulum in alle dele van die sitoplasma van die volwasse promiselium en teliospoor van U. maydis voor, maar dit word primêr geassosieer met laterale wande/septums. Dit kan moontlik

wees dat E.R. funksioneer in ensiem sekresie wat vir die afbraak van ekstrasellulêre materiale verantwoordelik kan wees.

Die matriks van die teliospore van U. maydis kleur donker en dit toon moontlik 'n lae vlak van hidrasie aan. Soortgelyke toestande word by E. casparyana (Fineran & Fineran, 1984) en T. caries (Allen et al., 1971) aangetref.

Die stadium van nukleusdeling en die uitbeweeg van die nukleus in die promiselium in kon nie in hierdie ondersoek waargeneem word nie. Dit is egter al deur ander navorsers vasgestel (Fisher & Holton, 1957; Ramberg & McLaughlin, 1980).

Die aanwesigheid van sferiese lipieddruppels is 'n opvallende kenmerk in die sitoplasma van die teliospore, die promiselium en die basidiums van U. maydis (Fig. 2.3-4 & 2.6-10). Die relatiewe belangrike rol wat lipiede en koolhidrate as reserwe materiale in fungus spore speel varieer by verskillende fungusgroepe (Fineran & Fineran, 1984). Weete het in 1980 vasgestel dat lipiede 'n belangriker rol as reserwemateriaal in spore speel as koolhidrate (Fineran & Fineran, 1984). By U. scitaminea is lipieddruppels volop teenwoordig en vertoon ook sferies in vries-ets replikas (Paine & Hess, 1984). Daar is egter geen vaste patroon van lipieddruppel vorming of -verdeling tydens die kieming van teliospore van U. maydis waargeneem nie. Met aanvang van kieming neem die grootte en hoeveelheid lipieddruppels toe (Fig. 2.3 & 2.4).

Die vakuole wat in U. maydis teenwoordig is, varieer in grootte en vorm en dit kan wys op verskillende funksies wat verrig word deur hierdie organelle. Ramberg & McLaughlin (1980) beweer dat vakuole funksioneer as bergingsruimtes (vir afvalstowwe) en ook as lisosome wat ensieme produseer. Die outeurs meen dat die promiselium nie vakuoleer tydens sporidiumvorming nie. Elektrondigte strukture kom in baie van die vakuole voor (Fig. 2.3 & 2.6-10). Daar is egter geen verklaring vir die funksie of doel van die strukture nie.

'n Ongeïdentifiseerde struktuur is in die kiemende teliospore van U. maydis waargeneem (Fig. 2.9). In T. controversa en T. caries het Allen *et al* (1971) 'n ongeïdentifiseerde struktuur beskryf wat min of meer 1,5µm in deursnee is, en het voorgestel dat dit glioksisome is. Die organelle by die twee Tilletia spesies het soms lipied fragmente wat geassosieer word met die buitenste oppervlakke en verander betekenisvol in vorm en inhoud tydens kieming. Ongeïdentifiseerde organelle is ook in spore van Tilletia spesies op Glyceria (Oh & Hess, 1982) en in kiemende teliospore van U. scitaminea (Paine & Hess, 1984) waargeneem. Die funksie van die ongeïdentifiseerde organelle is egter nie bekend nie.

Kieming :

In die meeste genusse wat tot die Ustilaginales behoort verdeel die diploïede nukleus tydens spoorkieming. Die diploïede nukleus van U. maydis beweeg in die promiselium in en kom tot stilstand min of meer in die middel van die promiselium waar die eerste

mitotiese deling plaasvind (Fisher & Holton, 1957). Nadat die eerste deling plaasgevind het, beweeg die nukleuse in teenoorgestelde rigtings weg van mekaar. Die twee nukleuse ondergaan meiotiese delings om 'n viersellige promiselium (basidium) te vorm waarvan elke sel uninukleêr is (Fig. 2.11). Die nukleus in die basale sel kan terug in die teliospoor in beweeg. Hierdie nukleus kan ook tydens die vorming van 'n tweede of sekondêre promiselium delings ondergaan. Die nukleus in die viersellige basidium verdeel en migreer in die ontwikkelende vier primêre sporidiums in (Fisher & Holton, 1957). In Fig. 2.14 kan waargeneem word dat 'n primêre sporidium holoblasties gevorm word. Dit is duidelik dat die basidiumsel uitstulp soos 'n sterigma tydens die sporidiumvorming (Fig. 2.12-2.14).

Volgens Hanna (1929) kan primêre sporidiums nadat dit afgeval het van die basidium af, vermeerder deur 'n gisagtige knopvormende proses. Dit is ook in hierdie ondersoek waargeneem (Fig. 2.22).

Hanna (1929) het spoorkieming van U. maydis bestudeer en bevind dat indien sporidiums op aktiefgroeiende mielieweefsel val, kiembuise gevorm word wat infeksie veroorsaak deur direkte penetrasie van die epidermis. In hierdie ondersoek is egter bevind dat kiembuise van die sporidiums slegs in die huidmondjies van die gasheerplant (Z. mays) vorm.

Ingold (1983) beweer dat met die ontwikkeling van die U. maydis basidium daar afsnoering tussen die boonste- en die onderste gedeelte van die basidium plaasvind. Hy meen dat 'n definitiewe "fragmentering sone" teenwoordig is. In hierdie ondersoek in Fig.

2.11 & 2.18 is afsnoering tussen die eerste- en tweede basidiumsel waargeneem. In Fig. 2.20 & 2.21 word die afsnoering tussen die tweede- en derde basidiumsel aangetref.

HOOFSTUK 3.

'n Ultrastrukturele histopatologiese studie van Ustilago maydis geïnfekteerde gasheer (Zea mays) weefsel.

Inleiding :

Na infeksie van Zea mays deur Ustilago maydis word die weefsel tot hipertrofie en hiperplasia gestimuleer.

Studies oor die verband tussen produksieverlies en die getal en grootte van galle (Immer & Christensen, 1931) asook die vegetatiewe groei van geïnfekteerde mielieplante gedurende die eerste drie weke na inokulasie (Billet & Burnett, 1978a), is gedoen. Die ondersoek van Mills (1978) het gehandel oor die epidemiologie van blaasbrand by mielies. Daar is egter nog geen gepubliseerde gegewens oor die ultrastrukturele histopatologie nie.

In hierdie deel van die ondersoek is die ultrastrukturele histopatologie van U. maydis geïnfekteerde mielieweefsel bestudeer.

Materiaal en Metodes :

Transmissie elektronmikroskopie (TEM) en ligmikroskopie :

Plantmateriaal :

Mielieplante (Cultivars A1616 en A210) is geplant in 25cm deursnee potte, in grond bestaande uit 'n mengsel van twee dele rooigrond, een deel riviersand, een- en 'n half dele saagsels en

een deel kompos. Vier pitte (verkry van Asgrow saadmaatskappy) is in die potte geplant op 'n diepte van $\pm 2,5$ cm. Nadat die koleoptiele verskyn het is twee plante verwyder.

Mielieplante is aanvanklik in die glashuis gekweek tot die drie- tot vier blaar stadium. Die melieplante is op die vier blaar stadium in 'n groeikamer by, relatiewe humiditeit van 55 - 70%, daglengte van 13 uur by temperatuur $23 \pm 2^\circ\text{C}$ en naglengte van 11 uur by temperatuur $16 \pm 2^\circ\text{C}$ gekweek.

Fungusmateriaal en inokulum :

Dieselfde voorbereidingstegnieke is gebruik soos in hoofstuk 2 (p. 13 - 14) beskryf, vir die kweek van fungusmateriaal.

Z. mays plante is geïnfecteer met inokulum bestaande uit teliospore, kiemende teliospore, sporidiums en steriele water. Infeksie is met behulp van 'n hipodermiese naald toegedien. Een cm^3 inokulum is op die drie - vier blaarstadium in die blaarskedes gespuit sonder plantbeskadijng. Een cm^3 inokulum is van bo af in die blaarkelk met 'n spuit in geforseer sonder beskadigings. Plante is ook met een cm^3 inokulum \pm drie cm bokant die groeipunt met die hipodermiese naald geïnokuleer.

Elf dae na inokulasie het simptome in die vorm van klein galletjies op die blare verskyn. Die galle en weefsel (een cm weerskante van die galle), is uitgesny vir die voorbereiding van ligmikroskopiese en TEM ondersoeke.

TEM

In hierdie ondersoek is slegs van jong galle gebruik gemaak, aangesien daar tydens voorlopige proewe probleme ervaar is, met groter/ouer galle, omdat die fungus slym produseer tydens galvorming. Dit het die probleem geskep dat die hars nie goed geïmpregneer het nie en so is die weefsel in die harsblokkies sag en onhanteerbaar.

In hierdie ondersoek is van verskillende fikseringstegnieke gebruik gemaak wat in Tabel 3.1 saamgevat word.

Tabel 3.1 : Fikseringstegnieke gebruik in die ondersoek.

Fikseringsmiddel	Temperatuur °C
2,5 % Glutaaraldehyd (Bullock, 1983)	10°C
	25°C
	45°C
Todd's (Todd, 1986)	10°C
	25°C
	45°C

Daar is egter geen wesenlike verskil in resultate tussen die twee fikseringstegnieke asook tussen die verskillende temperature waargeneem nie.

Vorbereidingstegnieke :

Dieselfde voorbereidingstegnieke is gebruik soos in hoofstuk 2 beskryf en die TEM voorbereidingsprosedure word in Fig. 2.2 (p. 15 - 17) saamgevat.

Ligmikroskopie :

Dieselfde voorbereidingstegnieke is gebruik as bg. soos by TEM wat in hoofstuk 2 (p. 15 - 17) saamgevat is.

Sneë met 'n dikte van 0,7 - 0,9µm is geny en met behulp van 'n houtstokkie opgetel en op 'n druppel water op 'n voorwerp glasie geplaas. Die voorwerpglasie met die sneë is op 'n warm plaat (40°C) geplaas en gelaat sodat die water verdamp en die sneë droog.

Die sneë is gekleur deur 'n druppel 1% Toluidienblou in 1% Boraks op die sneë op die voorwerpglasie te plaas. Die voorwerpglasie met die druppel Toluidienblou is terug op die 40°C warm plaat geplaas en na 10 sekondes is die oormaat Toluidienblou met behulp van gedistilleerde water afgewas. Die voorwerpglasie is terug op die warmplaat geplaas en gelaat sodat die oortollige water verdamp. Voorwerpglasies is permanent gemaak deur 'n druppel Entelan en 'n dekglasie op die sneë op die voorwerpglasie te plaas. Ligmikroskopiese ondersoeke is met behulp van 'n Nikon Optiphot gedoen.

Resultate :

Ultrastruktureel kon geen verskille tussen die geïnfekteerde plante van die twee mieliecultivars A1616 (weerstandbiedend) en A210 (vatbaar) waargeneem word nie.

Daar sal telkens by die mikrograwe gemeld word van watter fikseringstegnieke gebruik gemaak is.

Intersellulêre hifes :

Intersellulêre hifes groei in die middellamella van geïnfekteerde mesofilsele van die mielieplant (Fig. 3.1). In Fig. 3.1 kan ook moontlike ensiemaktiwiteit waargeneem word vir selindringing. Die primêre selwand word van die hife geskei deur 'n matrys van amorfe materiaal (Fig. 3.1).

Die membrane, ribosome en endoplasmiese retikulum, 'n vakuool en lipiede kan in die sitoplasma waargeneem word in 'n dwarsdeursnee van die intersellulêre hifes (Fig. 3.1 & 3.2).

Intrasellulêre hifes :

Intrasellulêre hifes kom verspreid in die gasheer protoplas voor (Fig. 3.3, 3.4, 3.6 & 3.7). Die wand is osmiofilies van aard en kom laminêr (Fig. 3.5) en granulêr (Fig. 3.7) voor. 'n Elektrondigte buitenste wand (Fig. 3.5) kom ook voor.

Die sitoplasma vertoon granulêr in 'n dwarsdeursnee van die intrasellulêre hifes (Fig. 3.5) Osmiofiliese strukture is waargeneem (Fig. 3.4-7). 'n Nukleus kan in Fig. 3.7 waargeneem word.

Ultrastrukturele veranderinge van geïnfekteerde gasheerweefsel :

Hipertrofie en hiperplasia kom voor tydens galvorming (Fig. 3.8). 'n Duidelike verskil is waargeneem tussen kontrole- (Fig. 3.8) en geïnfekteerde weefsel (Fig. 3.8).

FIGUUR 3.1 - 3.6 : Transmissie elektronmikrograwe van inter- en intrasellulêre Ustilago maydis hifes in Zea mays plante.

Simbole : Membrane (mb), endoplasmiese retikulum (er), vakuool (v), lipiede (l), nukleus (n), osmiofiliese strukture (os), hifewand (hw), gasheerselwand (sw), gasheer nukleus (N), chloroplaste (CL), hife (h).

Fig. 3.1 : 'n Intersellulêre hife groei in middellamella van gasheer. Fiksering : Todd's 25°C. Balkie = 1µm.

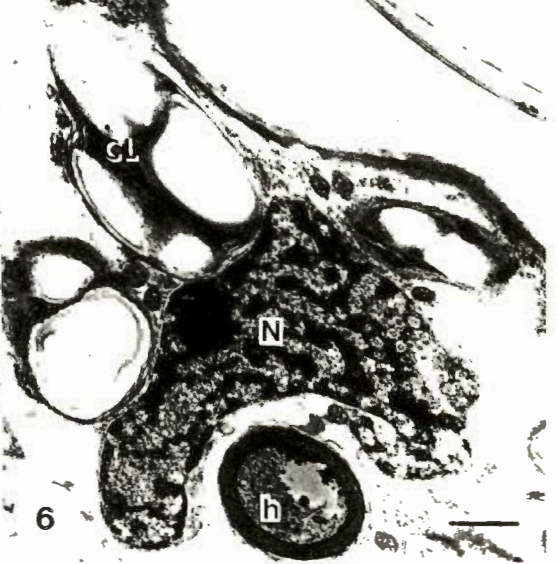
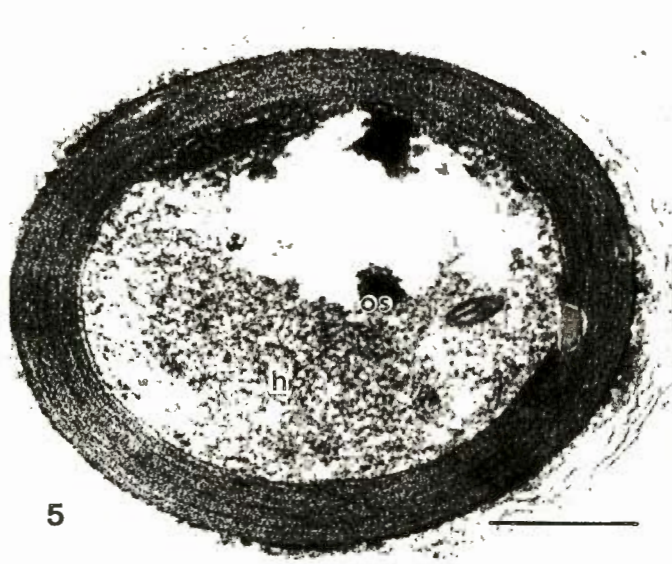
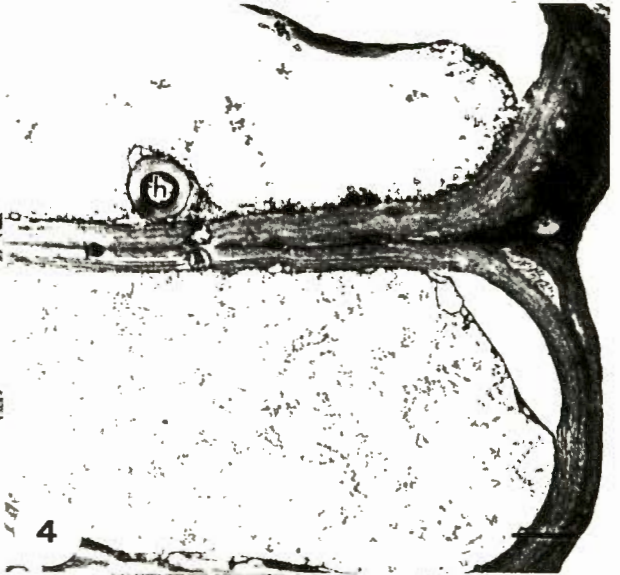
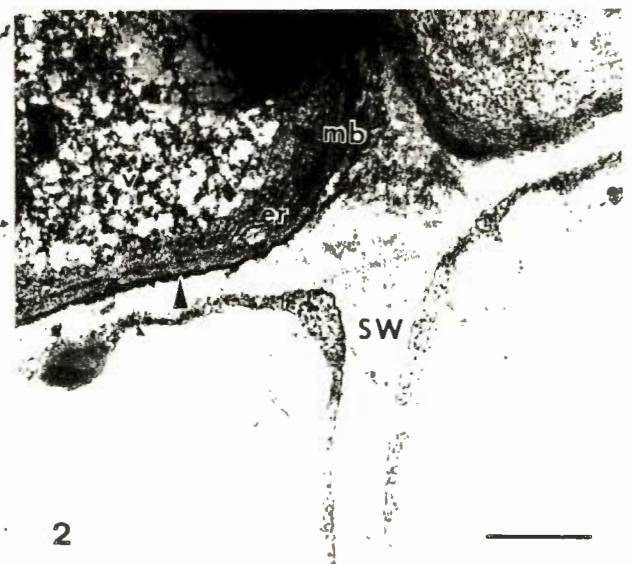
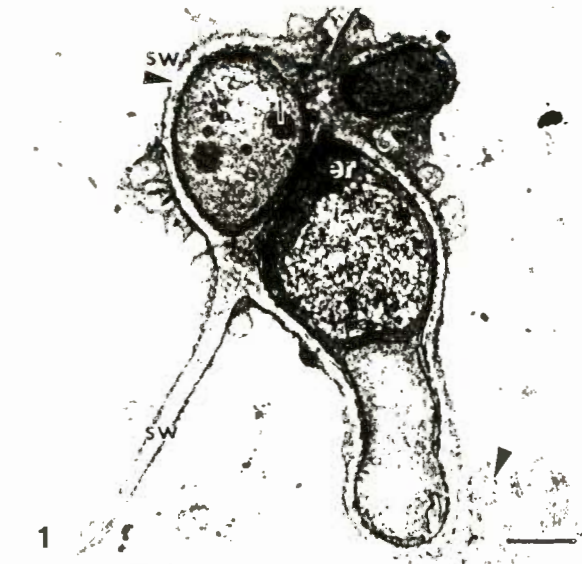
Fig. 3.2 : Organelle in intersellulêre hife in die gasheer middellamella. Fiksering : Todd's 25°C. Balkie = 0,5µm.

Fig. 3.3 : Intrasellulêre hifes kom verspreid in gasheer protoplas voor. Let op veranderende chloroplaste. Fiksering : Todd's 4°C. Balkie = 4µm.

Fig. 3.4 : Intrasellulêre hife in motorsel (van epidermis) van gasheer. Fiksering : G.A. 4°C. Balkie = 4µm.

Fig. 3.5 : Intrasellulêre hife se wand is osmiofilies van aard en kom laminêr voor. Fiksering : Todd's 4°C. Balkie = 0,5µm.

Fig. 3.6 : Intrasellulêre hife naby die nukleus van die gasheer geposisioneer. Fiksering : Todd's 4°C. Balkie = 1µm.



FIGUUR 3.7, 3.10, 3.12 : Transmissie elektronmikrograwe wat die invloed van Ustilago maydis hife groei in die gasheer selle aantoon.

FIGUUR 3.8 - 3.11 : Ligmikrograwe van ongeïnfekteerde- en geïnfekteerde weefsel.

Simbole : U. maydis nukleus (n), hife (h), gasheer selwand (sw), gasheervakuool (Va), hipertrofie (t), hiperplasia (p).

Fig. 3.7 : Matrysskede (pyltjie) rondom intrasellulêre hife. Fiksering : G.A. 4°C. Balkie = 1µm.

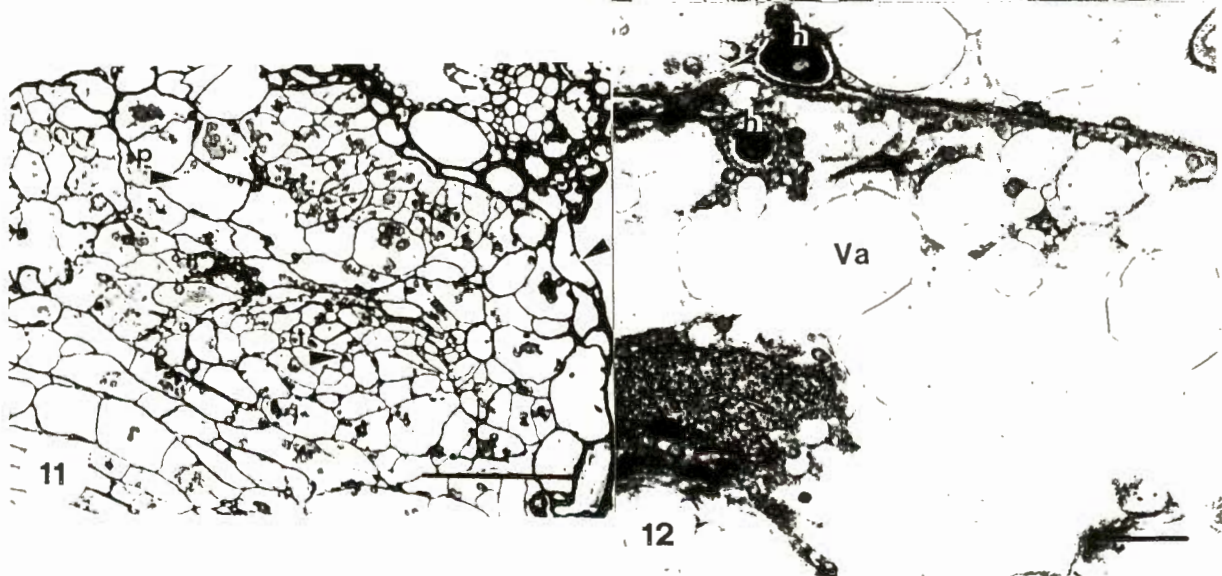
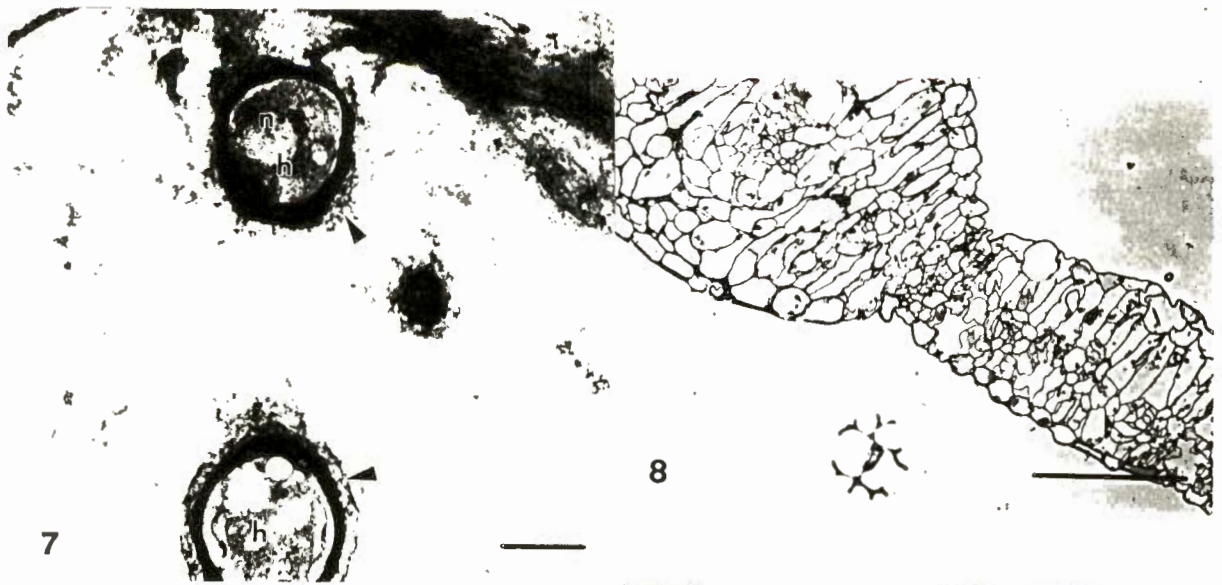
Fig. 3.8 : Dwarsdeursnee deur geïnfekteerde gasheerweefsel (blaarlamina) toon hipertrofie en hiperplasia tydens galvorming. Fiksering G.A. : 25°C. Balkie = 200µm.

Fig. 3.9 : Dwarsdeursnee deur ongeïnfekteerde blaarlamina. Fiksering : G.A. 25°C. Balkie = 100µm.

Fig. 3.10 : Selwand (pyltjie) en sitoplasma degradasie van 'n mesofilsel. Fiksering : G.A. 4°C. Balkie = 2µm.

Fig. 3.11 : Epidermisselwand (pyltjie) bly intakt tydens galvorming. Hipertrofie en hiperplasia waarneembaar. Fiksering : G.A. 25°C. Balkie = 50µm.

Fig. 3.12 : Vakuolering in mesofilsel. Intra- en intersellulêre hife is teenwoordig. Fiksering : G.A. 25 °C. Balkie = 3µm.



Nadat 'n jong gal gevorm is, met ander woorde nadat die fungus ontwikkel en groei kan selwand degradasie van die gasheer selle plaasvind (Fig. 3.10).

Die epidermis selwand bly intakt, selfs in 'n gal (Fig. 3.8 & 3.11). Vakuolering kom nie algemeen voor nie, maar kan tog soms voorkom (Fig. 3.12).

Die nukleus behou sy vorm en dubbele membraan in geïnfekteerde gasheer weefsel (Fig. 3.13), maar kan wel van vorm verander in die galweefsel (Fig. 3.14).

Die organelle wat die grootste ultrastrukturele veranderinge ondergaan is die chloroplaste. Die veranderinge vind anatomies en morfologies plaas. Die chloroplaste wat voorkom in die vaatbondelskede en die mesofil selle van ongeïnfekteerde selle, is wandstandig (Fig. 3.15 & 3.16). In Fig. 3.17 (weefsel), 3.18 (mesofil sel) en 3.19 (vaatbondelskede sel) is dit duidelik dat 'n losse rangskikking van chloroplaste voorkom. In Fig. 3.14 is die chloroplaste los gerangskik rondom die nukleus.

'n Opvallende kenmerk is die akkumulering van stysel in die chloroplaste van vaatbondelskede- en mesofil selle. Daar is 'n totale membraan- en granum afbraak in die chloroplaste wat in die vaatbondelskede van die geïnfekteerde plante voorkom (Fig. 3.18), indien vergelyk met die ongeïnfekteerde kontrole (Fig. 3.20). Die tilakoïed membrane disintegreer in die mesofil sel chloroplaste

FIGUUR 3.13, 3.14, 3.16, 3.18 : Transmissie elektronmikrograwe van geïnfekteerde- en ongeïnfekteerde gasheerweefsel.

FIGUUR 3.15, 3.17 : Ligmikrograwe van geïnfekteerde- en ongeïnfekteerde gasheerweefsel.

Simbole : Gasheernukleus (N), chloroplaste (CL).

Fig. 3.13 : Nukleus van mesofilsel van geïnfekteerde weefsel. Let op gewysigde chloroplaste. Fiksering : G.A. 45°C. Balkie = 4µm.

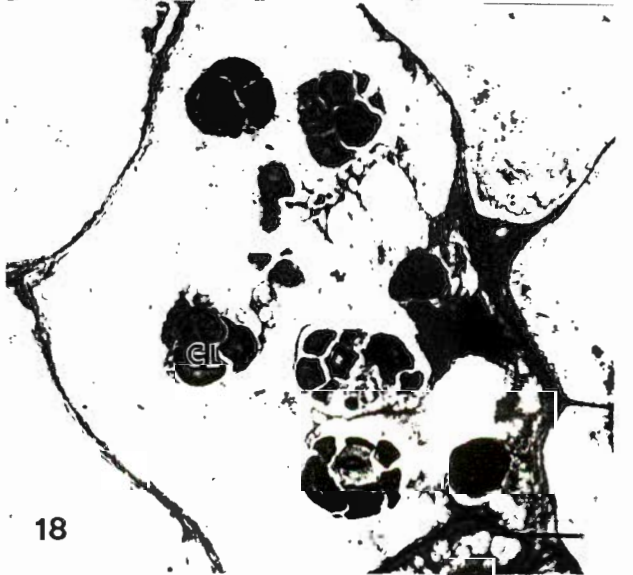
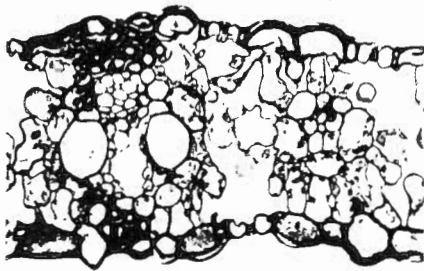
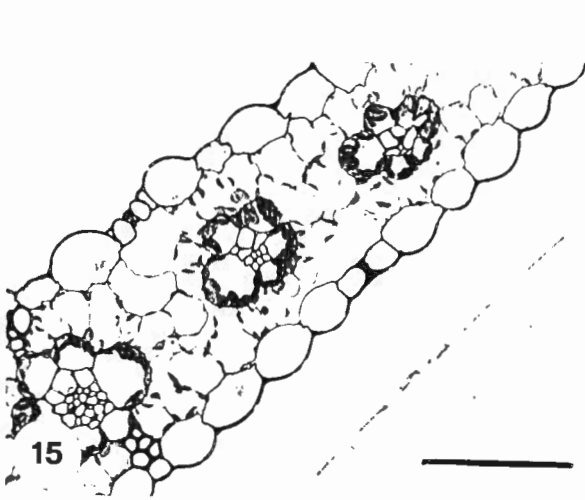
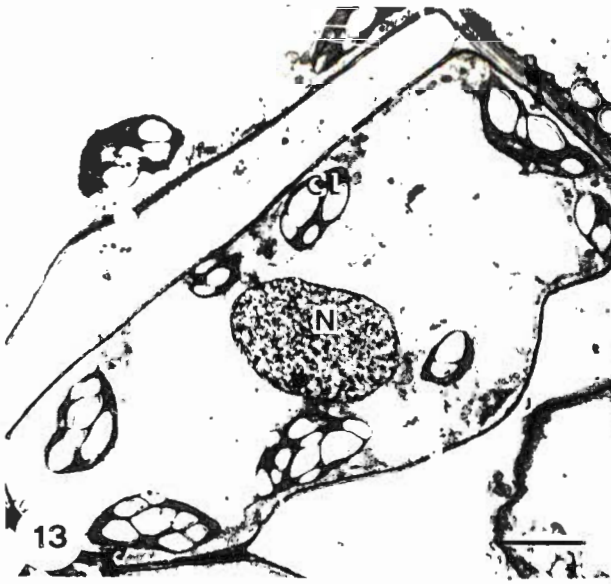
Fig. 3.14 : Nukleus van mesofilsel van geïnfekteerde weefsel in 'n gevorderde stadium van degradasie. Chloroplaste nog verder gedegradeer. Fiksering : Todd's 25°C. Balkie = 4µm.

Fig. 3.15 : Deursnee deur blaarlamina van gesonde mielieplant. Fiksering : G.A. 45°C. Balkie = 100µm.

Fig. 3.16 : Wandstandige chloroplaste in mesofil en vaatbondelskede van gesonde mielieweefsel. Fiksering : G.A. 45°C. Balkie = 3µm.

Fig. 3.17 : Deursnee deur blaarlamina van geïnfekteerde mielieplant. Let op groot mate van seldisorganisasie. Fiksering : G.A. 45°C. Balkie = 200µm.

Fig. 3.18 : Degenererende chloroplaste, losgerangskik in 'n geïnfekteerde mesofilsel. Fiksering : G.A. 45 °C. Balkie = 4µm.



FIGUUR 3.19 - 3.23 : Transmissie elektronmikrograwe van chloroplaste in geïnfekteerde en ongeïnfekteerde gasheerselle.

Simbole : Chloroplaste (CL), stysel (sy), gasheer nukleus (N).

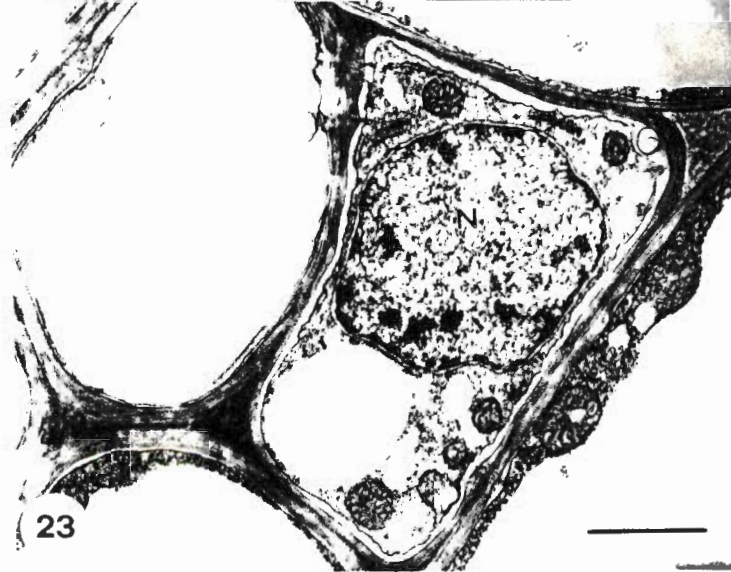
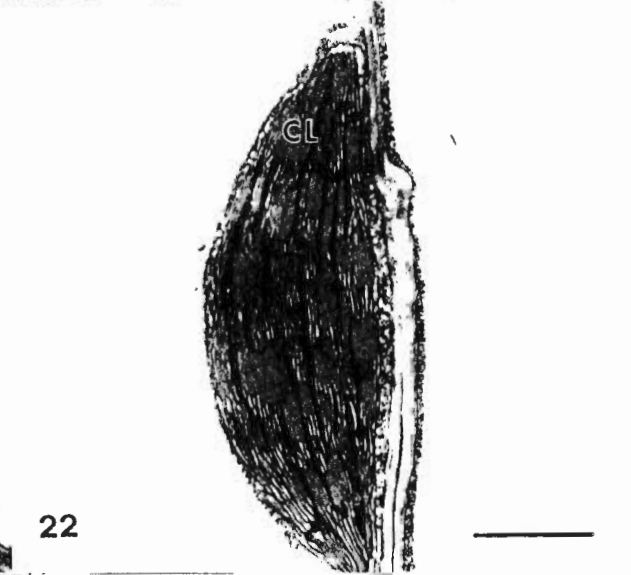
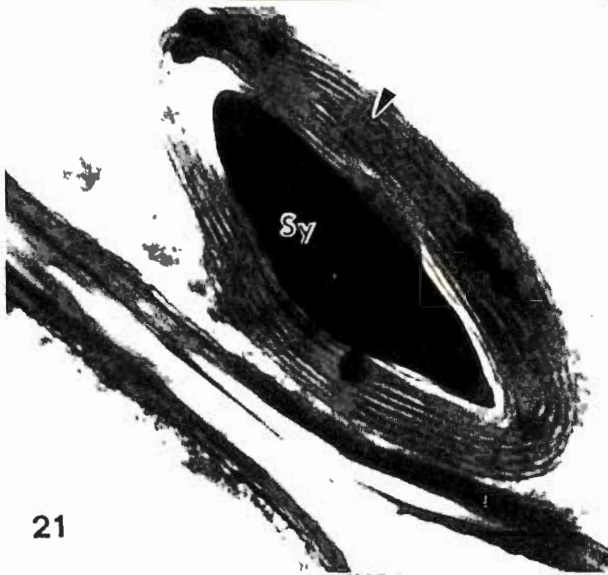
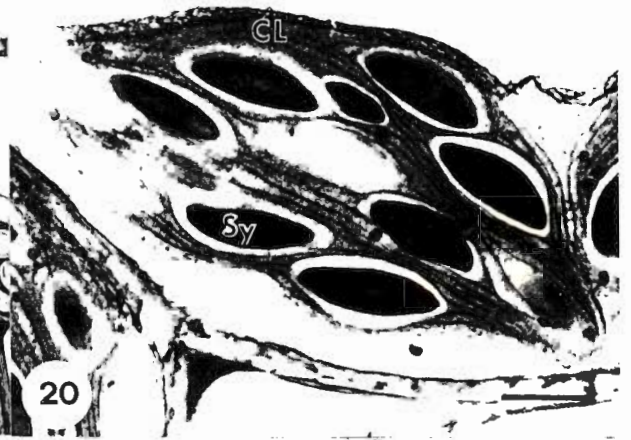
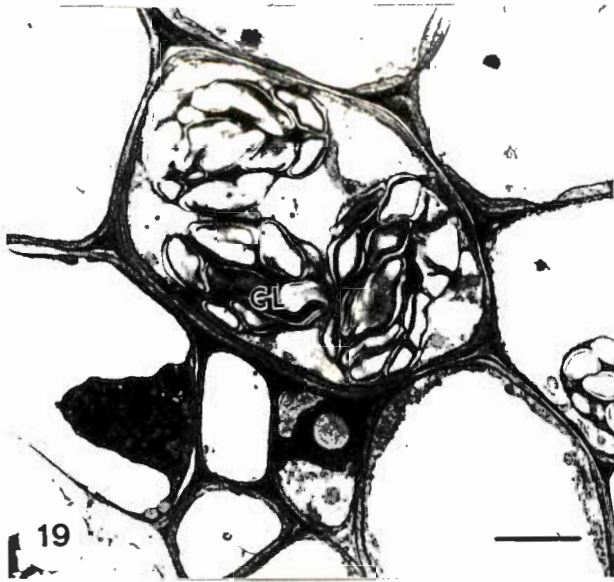
Fig. 3.19 : Chloroplaste losgerangskik en gedisorganiseerd in geïnfekteerde mesofil selle. Fiksering : G.A. 45°C. Balkie = 3µm.

Fig. 3.20 : Chloroplast met styselkorrels in ongeïnfekteerde vaatbondelskedesel. Fiksering : G.A. 4°C. Balkie = 1µm.

Fig. 3.21 : Stysel akkumuleer in geïnfekteerde mesofil sel in chloroplast en membraandegenerasie vind plaas. Fiksering : Todd's 25°C. Balkie = 0.5µm.

Fig. 3.22 : Membraansisteem is intakt in ongeïnfekteerde chloroplast. Fiksering : Todd's 25 °C. Balkie = 1µm.

Fig. 3.23 : Ongeïnfekteerde gasheersel. Fiksering : Todd's 25°C. Balkie = 1µm.



van geïnfekteerde plante (Fig.3.21) terwyl die tilakoïed membrane intakt bly in die mesofil selle van ongeïnfekteerde plante (Fig. 3.22). Die chloroplaste disintegreer soos gesien kan word in Fig. 3.21 waar slegs granum rondom 'n styselkorrel oorbly. Die chloroplaste van die vaatbondelskede en die mesofil selle word later nadat akkumulering van stysel plaasgevind het, gedegradear na vormlose organelle (Fig, 3.14, 3.18 & 3.19).

Bespreking :

In die ondersoek is op ultrastrukturele-, weefsel-, en selfs makroskopiese vlak geen verskille waargeneem tussen die twee mieliecultivars A1616 (weerstandbiedend) en A210 (vatbaar) nie. Dit dui daarop dat daar nie 'n waarneembare morfologiese verskil is tussen die twee cultivars nie.

Die intersellulêre hifes groei in die middellamella (Fig. 3.1) van twee aangrensende selle (Fig. 3.1). As gevolg van die elasticiteit van 'n selwand (Fahn, 1985), bly die primêre selwand intakt rondom die intersellulêre hifes wat in die middellamella ontwikkel (Fig. 3.1). Die selwand word van die hifewand deur 'n granulêre matrys geskei. Dit is onseker of hierdie matrys, gasheer of patogeen materiaal is.

Die intrasellulêre hifes kom verspreid voor in die gasheerprotoplas (Fig. 3.3-7). Die wande van die hifes wat voorkom in die mesofil is dikker as die mesofil selwande (Fig. 3.3), maar dunner as die van die epidermisselwand (Fig. 3.4). Dit kan op die groot kompleksiteit van die hife selwand samstelling

dui. Shaw & Manocha (1965) het bevind dat die haustorium selwand dunner is as die mesofilselwande van Puccinia graminis geïnfekteerde koringblare. Die hifewand van U. maydis bestaan uit dun lagies fibrillêre- en granulêre materiaal (Fig. 3.5). Indien langer gekleur met die Uranielasetaat kan die osmiofiliese aard van die wand duidelik waargeneem word. Laasgenoemde kan daarop dui dat die wand ryk is aan lipiede wat gunstig is vir die vervoer van nie-polêre stowwe. (Williams & Yukawa, 1967).

Daar word verwys na die ekstrasellulêre matrys rondom die intrasellulêre hifes as die skede wat gevorm word tussen die hifes en die sitoplasma van die gasheer. Die skede vorm 'n sone waar materiale vervoer kan word tussen gasheer en patogeen (Slusher et al., 1974). Die skede tussen U. maydis hifes en Z. mays sitoplasma in hierdie ondersoek kom fibrillêr (Fig. 3.5 & 3.6) en granulêr (Fig. 3.7) voor. Shaw & Manocha (1965) het bevind dat die skede wat gevorm word in P. graminis geïnfekteerde koringblare, uit stringe endoplasmiese retikulum en elektrondigte materiaal van ongeïdentifiseerde aard bestaan. Die rand van die skede tussen U. maydis hife en Z. mays is nie eweredig aaneenlopend nie en dit kan dui op 'n vergroting van die oppervlak. So 'n vergroting van skede oppervlak is ook gevind in Erysiphe graminis (Ehrlich & Ehrlich, 1983). Die skede tussen P. sorghi en Z. mays selle bevat elektrondigte strukture wat amorf is (Van Dyke & Hooker, 1969). In die skede van U. maydis hife is 'n soortgelyke verskynsel waargeneem (Fig. 3.7). Dit dui op 'n beskermingsgrens tussen gasheerselle en intersellulêre hifes.

Volgens Stavely et al., (1969) kan die skede ook op 'n parasitiese voedingsverhouding tussen gasheer en patogeen dui.

Ultrastrukturele veranderinge kan op weefselvlak waargeneem word. (Fig. 3.8 & 3.9). Die gasheer word tydens galvorming tot hipertrofie (selvermeerdering) en hiperplasia (selvergroting) gestimuleer (Fig. 3.8 & 3.9). Dit is onseker of die fungus 'n stof afskei wat die plantselle tot hipertrofie en hiperplasia stimuleer. Sitokinien is verantwoordelik vir seldeling (Dekhuijzen, 1976) en auksien is betrokke by selvergroting (Pegg, 1976). Dus kan sitokinien hipertrofie en auksien hiperplasia veroorsaak en die hormone kan betrokke wees by galvorming. Albugo candida geïnfekteerde Capsella bursa-pastoris plante toon hipertrofiese groei en auksiene (IAA en IAN) is in die geïnfekteerde plante gevind (Pegg, 1976).

Volgens Billet & Burnett (1978b) verander die normale translokasierigting van assimilate in brandfungus geïnfekteerde plante. Meer voedingstowwe word na die galweefsel vervoer en voedingstowwe konsentreer ook meer rondom die galle (Billet & Burnett, 1978b).

Hifes hoef nie noodwendig teenwoordig te wees in weefsel vir die produksie van hormone of degraderingsstowwe nie. Met ander woorde stowwe kan deur die geïnfekteerde weefsel vervoer word, as fungusreaksie of as gasheerreaksie. Selwanddegradasie kan plaasvind sonder die teenwoordigheid van U. maydis hifes (Fig. 3.10). Dit kan 'n moontlike weerstandsmeganisme van die gasheer

wees om 'n nekrotiese gebied daar te stel om sodanige verdere groei en ontwikkeling van die fungus te inhibeer.

Die epidermisselwand bly intakt, selfs in galvormende weefsel. Geen wandverdikking kom in die epidermisselwande voor nie (Fig. 3.4, 3.8 & 3.11). 'n Moontlike rede hiervoor is dat die epidermisselle later die volwasse gal"membraan"/omhulsel uitmaak, wat eers bars as die gal ryp is (dit kan gesien word in die mikrograaf (Fig. 5.9) in Hoofstuk 5).

Vakuolering is nie 'n merkwaardige ultrastrukturele verandering wat plaasvind nie. Daar is min vakuole waargeneem. Dit kan wys op afbraak van die tonoplast en dat die vakuoolinhoud vir verdere groei en ontwikkeling gebruik kan word (Hanchey & Wheeler, 1970). Verandering in vakuole wys op permeabiliteitsverandering van die plasmalemma en/of die tonoplast (Hanchey & Wheeler, 1970).

Die nukleus ondergaan nie merkwaardige ultrastrukturele veranderinge nie (Fig. 3.13). Die nukleus kan wel van vorm verander, wat kan wys op membraanafbraak (Fig. 3.14).

Daar kom merkwaardige morfologiese- en anatomiese veranderinge in die ultrastruktuur van chloroplaste van U. maydis geïnfecteerde plante voor. Chloroplaste is wandstandig in die mesofil sowel as die vaatbondelskede in ongeïnfecteerde mielieweefsel (Fig. 3.15 & 3.16). In geïnfecteerde weefsel is die chloroplaste losgerangskik (Fig. 3.17-19). Die chloroplaste rangskik kenmerkend in sommige gevalle rondom die nukleus (Fig. 3.14). Dit kan op disorganisasie van organelle dui. Die lamellêre sisteem van die chloroplaste

verval, deurdat membraan- en granumafbraak in totaal in die geïnfekteerde weefsel kan voorkom (Fig. 3.19-21), Die tilakoïed membrane van die chloroplaste van geïnfekteerde mesofil selle disintegreer en dit kan wys op 'n totale afbraak van die fotosintese-apparaat van die gasheerblaar.

Nog 'n merkwaardige verskynsel is die akkumulering van stysel in sowel die mesofil selle en die vaatbondelskede in geïnfekteerde weefsel. Uit 'n vorige ondersoek (Hoofstuk 2) is bevind dat die teliospore wat die oorlewingspore is 'n hoë konsentrasie lipiede bevat. Lipiede is ook in die ondersoek in die hifes waargeneem (Fig. 3.1). Die styselakkumulering van die gasheer en die hoë lipied konsentrasie van die patogeen wys op die verskille in die basiese weë van die energie-storings metabolismes van die twee organismes (Williams & Yukawa, 1967). Die chloroplaste word later nadat akkumulering van stysel plaasgevind het, gedegradeer na vormlose organelle (Fig. 3.14, 3.18 & 3.19).

HOOFSTUK 4.

Chlorofilfluoresensie in vivo as maatstaf van patogenese in mielieplante geïnfekteer met Ustilago maydis.

Inleiding :

Die afgelope dekade is chlorofil-a-fluoresensiemetings toenemend aangewend in verskeie gebiede van die plantfisiologie. Chlorofilfluoresensie in vivo kan as maatstaf dien om selbeskadiging, veroorsaak deur omgewingstres, te moniteer (Smillie & Hetherington, 1983). Die metode is nie-destruktief en maklik om uit te voer.

Gedurende die proses van ligabsorpsie en energie-oordraging, word 'n klein gedeelte van die lig heruitgestraal vanaf die chlorofilmolekule wat met die reaksiesentrums geassosieer is. Hierdie heruitgestraalde lig word chlorofilfluoresensie genoem (Samuelson & öquist, 1977).

Die eienskappe van die chlorofilfluoresensie-induksiekrommes (Kautsky-krommes) word beïnvloed deur enige faktor wat die fotosintetiese metabolisme direk of indirek beïnvloed (Samuelsson & öquist, 1977). Om hierdie rede kan die meting van chlorofilfluoresensie 'n unieke moontlikheid bied om die effek van infeksie deur U. maydis op die integriteit van die tilakoïedmembraansisteem te bestudeer en om inligting aangaande stres of beskadiging aan die fotosintese-apparaat van die gasheer aan te dui, voordat enige sigbare simptome verskyn.

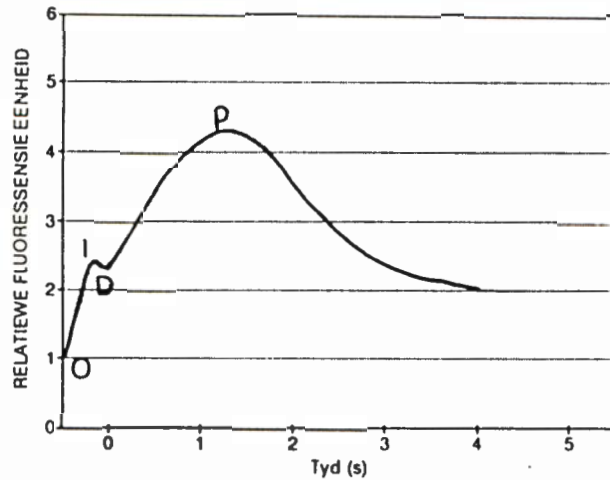
Shaw et al., (1985) beweer dat chlorofilfluoressensie induksiekrommes karakteristieke parameters het, wat aangewend kan word om die effek van stresfaktore op die primêre prosesse van fotosintese te kwantifiseer. So word die I/P-verhouding gebruik om die beskadiging van die fotosintese-apparaat aan te dui, met ander woorde 'n hoë I/P-verhouding beteken 'n hoë mate van beskadiging van die fotosintese-apparaat van die plant en 'n lae I/P-verhouding beteken 'n mindere mate van beskadiging. Die I/P-verhouding is bereken, soos beskryf deur Mennega et al., (1990).

Materiaal en Metodes :

Plant- en fungusmateriaal is op dieselfde wyse gekweek en plante geïnfekteer soos beskryf in Hoofstuk 3 (p. 32 - 33).

Deur gebruik te maak van 'n fluorometer (SF-10, Richard Brancker, Canada) is vanaf dag nul (voor inokulasie) daaglik fluoressensieinduksiemetings van die kontrole- en proefplante uitgevoer. Die verhouding van die hoogte van die infleksiepunt I tot die van die maksimum fluoressensie P, is uit die onderskeie induksiekrommes bereken (Fig. 4.1).

FIGUUR 4.1 : Tipiese chlorofilfluoressensie-induksiekromme van 'n donkeraangepaste blaar.



Meting is volgehou totdat die I/P-verhouding van die geïnfekteerde plante 'n waarde van 1,00 bereik het wat daarop dui dat 'n hoë mate van remming van fotosintetiese elektronvervoer reeds plaasvind.

Die geïnfekteerde plante is in die groeikamer gehou by, 'n relatiewe humiditeit van 55-70%, 'n daglengte van 13 uur by 'n temperatuur van $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ en 'n naglengte van 11 uur by 'n temperatuur van $16 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Resultate en Bespreking :

Die resultate van die chlorofilfluoressensiemetings word in Tabel 4.1. gegee.

Tabel 4.1 : Fluoressensiewaardes vir twee mieliecultivars uitgedruk as I/P-verhouding en as persentasie van die kontrole oor 'n periode van elf dae.

Mieliecultivar A1616 :

Daag	I/P verhouding 1	I/P verhouding 2
0	0,232 ± 0,001	100,00
1	0,266 ± 0,014	114,65
2	0,288 ± 0,023	124,14
3	0,325 ± 0,01	140,01
4	0,442 ± 0,053	190,52
5	0,558 ± 0,058	240,52
6	0,701 ± 0,02	302,12
7	0,801 ± 0,02	345,25
8	0,864 ± 0,005	372,41
9	0,877 ± 0,011	378,02
10	0,959 ± 0,043	413,36
11	1,0 ± 0,00	431,03

I/P-verhouding 1 - gemiddelde waardes van twee herhalings met aanduiding van die standaardafwyking.

I/P verhouding 2 - as persentasie van kontrole.

Mieliecultivar A210 :

Dag	I/P verhouding 1	I/P verhouding 2
0	0,176 ± 0,018	100,00
1	0,231 ± 0,003	131,25
2	0,246 ± 0,016	139,77
3	0,326 ± 0,076	185,23
4	0,391 ± 0,016	222,16
5	0,564 ± 0,044	320,45
6	0,661 ± 0,034	375,57
7	0,684 ± 0,104	388,63
8	0,818 ± 0,136	464,77
9	0,906 ± 0,055	514,77
10	1,0 ± 0,00	568,18
11	1,0 ± 0,00	568,18

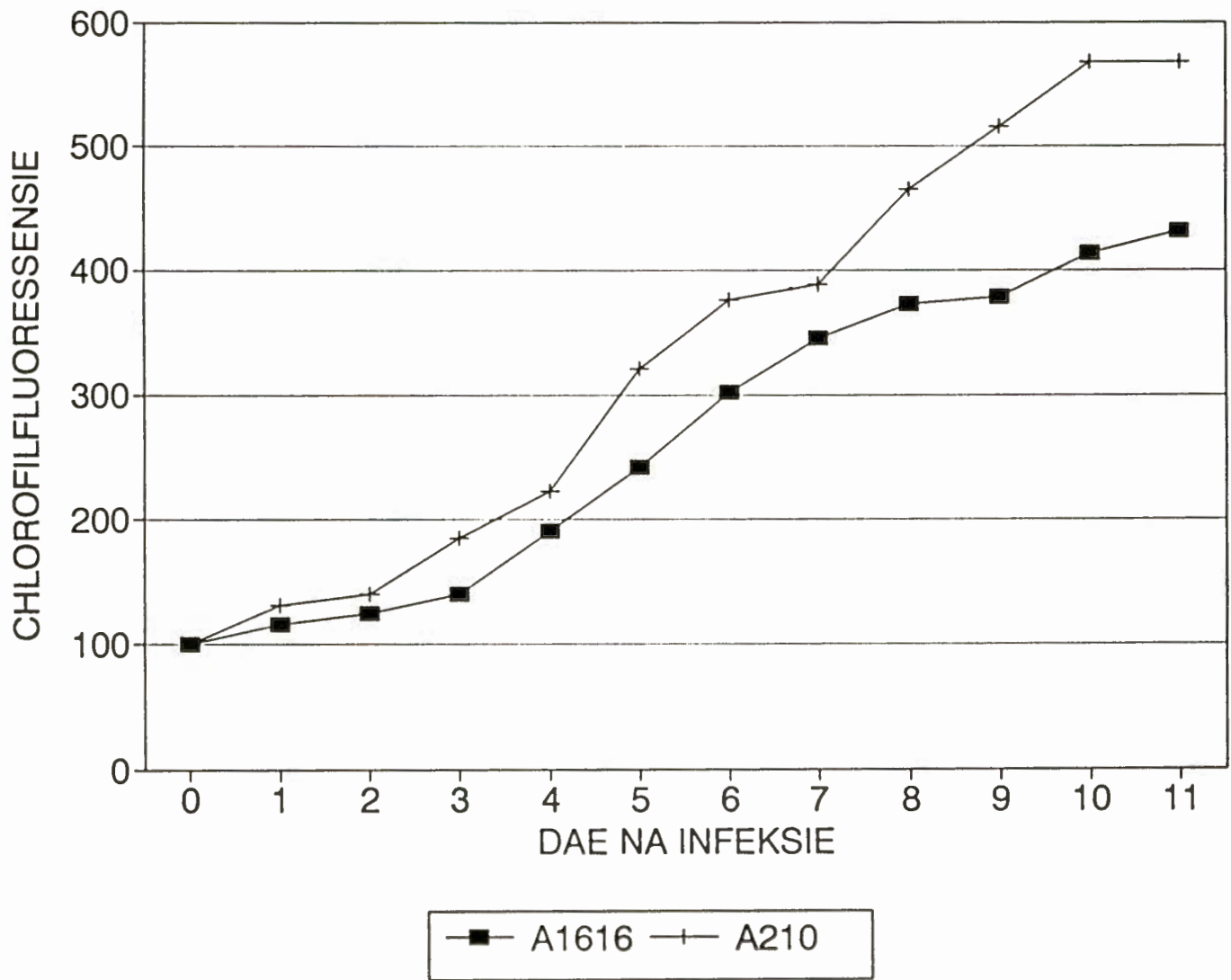
I/P-verhouding 1 - gemiddelde waardes van twee herhalings met aanduiding van die standaardafwyking.

I/P-verhouding 2 - as persentasie van kontrole.

In Fig. 4.2 word 'n grafiese voorstelling van die I/P-verhouding teenoor die aantal dae na inokulasie weergegee.

'n Duidelike verskil is waarneembaar in die fluoressensie van die twee mielieplantcultivars.

FIGUUR 4.2 : Chlorofilfluoresensie : I/P-verhouding uitgedruk as persentasie (%) van die kontrole teenoor die aantal dae na infeksie.



Die cultivar A210 is meer gevoelig vir infeksie as die cultivar A1616. Dit is fisiologies duidelik waarneembaar want vanaf 24 uur na infeksie is die I/P-verhouding van A210 hoër as die van A1616. Na 11 dae is beskadiging van die fotosintese-apparaat ook heelwat hoër by A210 as by A1616 ('n verskil in I/P-waarde van 136,15). Die omvang van beskadiging van A210 is dus baie meer intens soos blyk uit die I/P-verhoudingwaardes.

Gedurende die latente periode (d.w.s. tussen inokulasie en simptoomberskyning) kon geen uitwendige sigbare verskille waargeneem word nie. Makroskopiese simptome van die geïnfekteerde plante het eers 30 dae na infeksie in hierdie spesifieke proef verskyn. Dus is hierdie fluoressensietoetse belangrik in die sin dat dit 'n in vivo aanwyser is van plantbeskadiging voordat sigbare simptome verkyn.

Buchanan et al., (1981) vermeld 'n verandering in die fotosintesetempo van die plant as geheel of by intakte blare as gevolg van blaarsiektes. Infeksie deur verpligte patogene verlaag in die meeste gevalle die fotosintesetempo van blare. Dit wil voorkom of die indringende patogeen 'n blokkering in die nie-sikliese elektronvervoerketting van die gasheer veroorsaak, soos gevind by roes geïnfekteerde Vicia faba plante (Montalbini et al., 1981).

Die tempo van verandering in die fotosintese van geïnfekteerde plante spruit voort uit die effek wat die miselium ontwikkeling op die gasheer het (Buchanan et al., 1981). Uit hierdie ondersoek is dit duidelik dat die vegetatiewe ontwikkeling van U. maydis in die gasheer 'n verandering in die fotosintese tempo veroorsaak. Ultrastrukturele veranderinge in die chloroplaste in U. maydis geïnfekteerde mielieplante is in Hoofstuk 3 bespreek. Daar is bevind dat die chloroplaste morfologiese- sowel as anatomiese veranderinge ondergaan. Die fluoressensietoetse dui dus daarop dat daar reeds 'n vroeë verandering in die chloroplaste mag plaasvind. Hierdie verandering is egter eers elektronmikroskopies waarneembaar wanneer galvorming begin.

HOOFSTUK 5.

Galvorming van Ustilago maydis in geïnfekteerde mielieplante :
Skandeer Elektronmikroskopiese studies.

Inleiding :

Volwasse galle van U. maydis bestaan uit 'n massa teliospore (rustende/oorlewingspoor). Deml et al., (1980) het lig- en skandeer elektronmikroskopiese ondersoeke van die spoorvorming van U. pustulate en U. scabiosae gedoen, terwyl Trione (1980) studies van teliospoorvorming by U. scitaminea gedoen het.

Aangesien Ustilago maydis wat 'n biotrofe fungus is, slym produseer tydens galvorming, was dit waarskynlik 'n belemmering om die reprodktiewe stadium van die fungus te bestudeer.

In hierdie ondersoek is van die poli-etileen glikool (PEGS) metode (Nagele et al., 1984) en die osmiumtetroksied dampfikseringstegniek (Tiedt et al., 1987) gebruik gemaak ten einde die galvorming as volwasse stadium in die lewensloop van U. maydis in Z. mays te bestudeer.

Materiaal en Metodes :

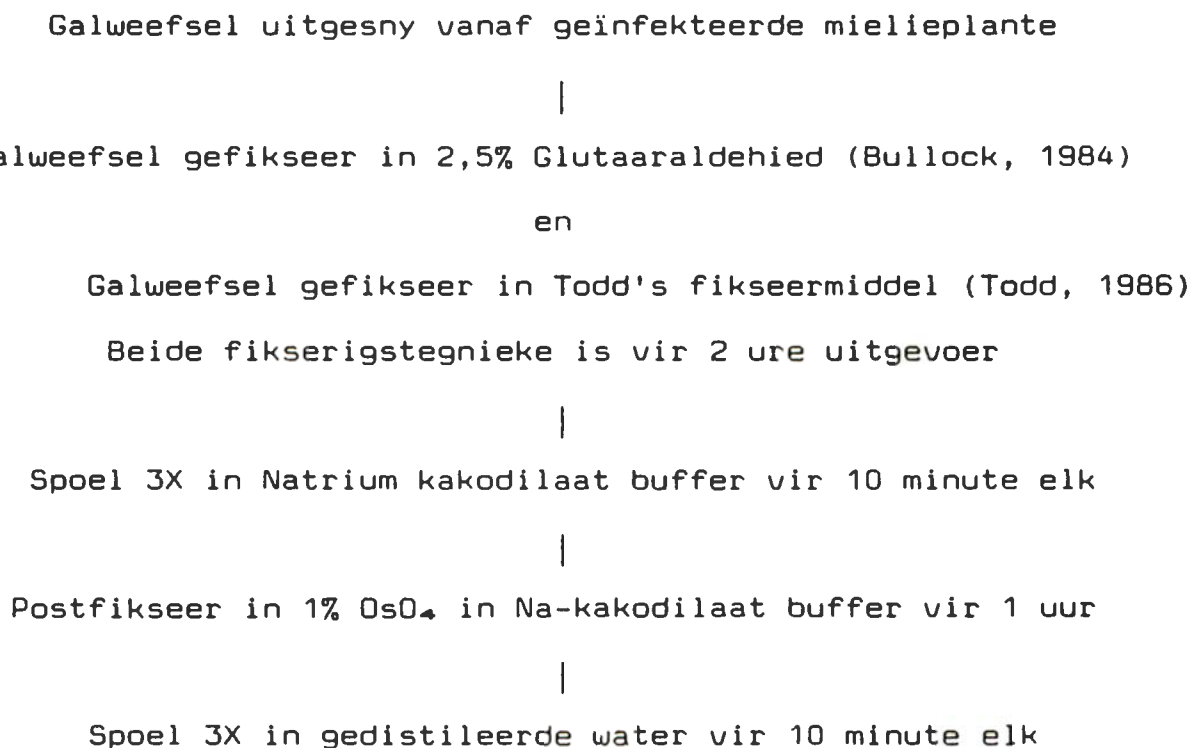
Die prosedures vir plantinfeksie met die fungus was dieselfde as beskryf in Hoofstuk 3 (p. 33).

Skandeer elektronmikroskopie (SEM) :

Poli-etileen glikool (PEGS) voorbereiding :

Vir hierdie ondersoek het die makroskopiese simptome op die mielieplante 11 dae na inokulasie verskyn. Galle is dag 11, 12, 13 en 14 uitgesny vanaf die mielieblaar en voorberei volgens die PEGS metode van Nagele *et al.*, (1984). Daar is egter 'n paar wysigings op die Nagele *et al.*, (1984) metode in hierdie ondersoek van gebruik gemaak. Die voorbereidingstegniek word in Fig. 5.1 saamgevat. Twee verskillende fikseringsmiddels is gebruik.

Figuur 5.1 : Vloediagram om die SEM voorbereidingsproses van PEGS (Nagele *et al.*, 1984) soos gewysig vir hierdie ondersoek toegepas, gegee :



|
Dehidreer in etanol reeks; die eerste 3 verdunnings 15 minute
elk en die ander 1 uur elk

(10%, 20%, 30%, 50%, 70%, 95%, 100%, 100%)

|
Bogenoemde stappe word by kamertemperatuur uitgevoer

|
1:1 mengsel 100% Etanol en PEGS (6000 mol. massa) vir 1 uur by
60°C met gereelde beweging

|
2X in 100% gesmelte PEGS by 60°C vir 2 uur

|
Bed in vars gesmelte PEGS in Teflongietvorm in en laat by
kamertemperatuur in 'n desikator tot gestol

|
Werk blokkie grof af m.b.v. 'n lemmetjie en dan fyn af met 'n
glaslem m.b.v. 'n mikrotoom

|
Verskeie ruilings in 95% Etanol by 37°C vir 2 uur

|
2X in absolute Etanol vir 2 uur by kamertemperatuur

|
2X in 100% Asetoon vir 2 uur

|
Kritiese droging in absolute Asetoon met vloeibare CO₂

|
Monteer weefsel op SEM knopies m.b.v. Koolstofgom

|
Blitsbedamp met Koolstof (\pm 2 sek.)

|
Bedamp met Goud/Palladium (Stroomsterkte : 5mA)

(3 maal vir 3 minute elk met 'n tussen periode van 5 minute)

Geen opmerklige verskille is waargeneem tussen glutaaraldehyd en Todd's gefikseerde eksemplare nie.

Die galweefsel is met 'n Cambridge Stereoscan 250S skandeer elektronmikroskoop ondersoek by 'n werkspanning van 10kV.

Osmiumtetroksied Dampfikserings tegniek :

Dieselfde voorbereidingstegnieke is gebruik soos in Hoofstuk 2 (p. 13 - 14) beskryf vir OsO_4 dampfiksering (Tiedt et al., 1987).

Die voorbereide eksemplare is soos bo genoem met 'n Skandeer elektronmikroskoop ondersoek.

Resultate :

In Fig. 5.2 word mesofilweefsel wat aangrensend is aan 'n jong gal (11 dae na inokulasie) getoon. Die miselium ontwikkel intrasellulêr. In Fig. 5.3 kan 'n intrasellulêre hife in 'n epidermissel waargeneem word.

In Fig. 5.4 word hipertrofie en hiperplasia waargeneem wat plaasvind tydens galvorming. Vaatbondels van die gasheer binne 'n gal raak gedisorganiseerd (Fig. 5.4 & 5.5). In Fig. 5.4 is 'n vaatbondel nie onderskeibaar van omliggende galweefsel nie. In

Fig. 5.5 is 'n vaatbondel waarneembaar wat nog goed georganiseerd is.

Met die aanvang van teliospoorvorming word slym geproduseer in die gasheerweefsel (Fig. 5.5 & 5.6). In Fig. 5.7 is waargeneem dat die teliospore in 'n slymmaassa/omhulsel gevorm word. Dit is nog 'n vroeë fase van galvorming. Die teliospore is nog nie volwasse in Fig. 5.7 nie aangesien die stekels wat die buitenste/eksogene wand van die teliospoor uitmaak, nog nie goed gedefinieer is nie. Van die teliospore is in hierdie mikrograaf (Fig. 5.7) deurgesny en duidelik kan die lipied druppels wat in hoofstuk 2 beskryf is waargeneem word.

'n Massa teliospore word gevorm in die galle van U. maydis in die gasheerplant (Fig. 5.8 & 5.9). Tydens rypwording van die gal, verdroog of disintegreer die slym (Fig. 5.8).

Gasheer selle bly intakt gedurende die groei en ontwikkeling van die patogeen se hifes (Fig. 5.2 & 5.3). Weefsel verval tydens die vorming van teliospore (Fig. 5.6, 5.7 & 5.9).

Die epidermislaag van die gasheer bly intakt gedurende die groei en ontwikkeling van die fungus, inter- en intrasellulêr. Die epidermis is dan ook deel van die omhulsel/"membraan" wat deel van die volwasse gal uitmaak en wat skeur of oopbars tydens die vrystelling van die teliospore (Fig. 5.9).

Bespreking :

Ustilago maydis hifes groei verspreid in die geïnfecteerde gasheerweefsel (Fig. 5.2 & 5.3). Dit is duidelik dat voor

galvorming nie selwanddegradasie plaasvind, as gevolg van die groei van die hife nie (Fig. 5.2 & 5.3). Hife groei deur die selwande, dus kan ensiemaktiwiteit (pektinase en sellulase) betrokke wees (Fig. 5.2 & 5.3). Die hifes kan heg aan gasheer selorganelle (Fig. 5.3), moontlik vir 'n voedings verhouding tussen gasheer en patogeen.

Aangesien hipertrofie en hiperplasia plaasvind tydens galvorming (Fig. 5.4), moet hormoon aktiwiteit hier betrokke wees. Hormone betrokke is sitokinien (hipertofie) en auksien (hiperplasia) (Dekhuijzen, 1976 : Pegg, 1976). Dit is onseker of dit 'n reaksie van die gasheer is deur stimulering van die patogeen en of die patogeen moontlik die hormone kan produseer en afskei.

Volgens Billet & Burnett (1978b) word abnormale hoeveelhede voedingstowwe na U. maydis geïnfekteerde gasheerweefsel vervoer en dat die voedingstowwe rondom die galweefsel konsentreer. In Fig. 5.5 is dit duidelik dat 'n vaatbondel tussen twee galle normaal vertoon en selfs in 'n jong gal. Die vaatweefsel raak egter gedisorganiseer in ontwikkelende galweefsel (Fig. 5.4).

Tydens galvorming word slym geproduseer (Fig. 5.5 en 5.6). Verskillende oorsake kan vir hierdie slymproduksie aangevoer word. Dit is dat die gasheerweefsel gedisorganiseer raak as reaksie op patogeen stimulus. Die hifes van U. maydis kan ook die slym produseer wat die teliospoorvorming voorafgaan. Dit kan as moontlike voeding/beskerming vir die nuut gevormde teliospore dien.

FIGUUR 5.2 - 5.7 : Skandeer elektronmikrograwe van geïnfekteerde gasheer weefsel wat deur U. maydis geïnfekteer is.

Simbole : Hife (h), gasheerselwand (sw), vaatbondel (vb), slym (sl), teliospoor (ts), stekels (st), epidermis (ep), hipertrofie (t), hiperplasie (p).

Fig. 5.2 : Intracellulêre miselium in mesofiliselle van geïnfekteerde mielieblaar, 11 dae na inokulasie. Balkie = 40 μ m.

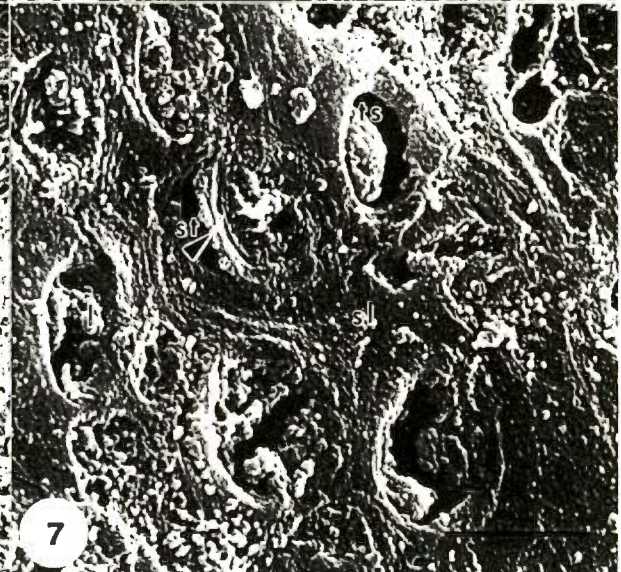
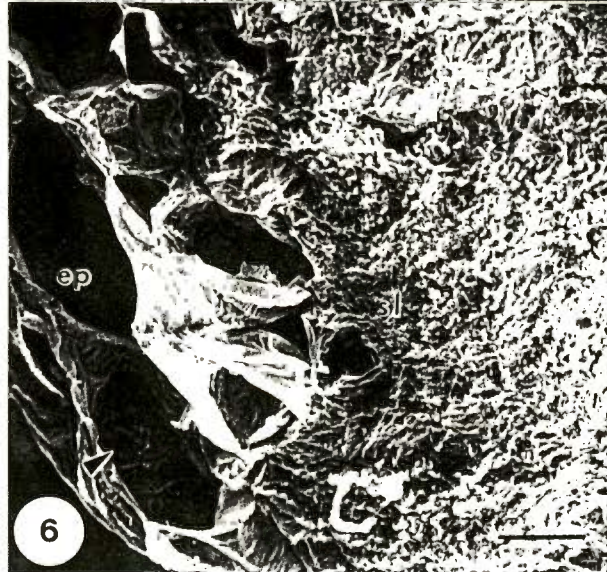
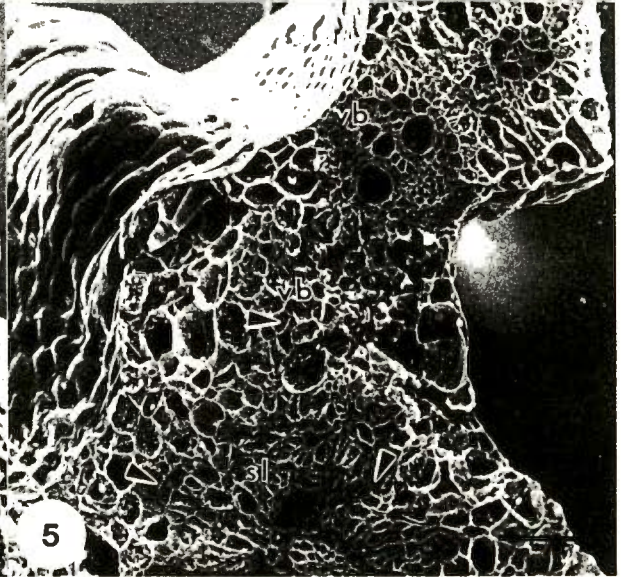
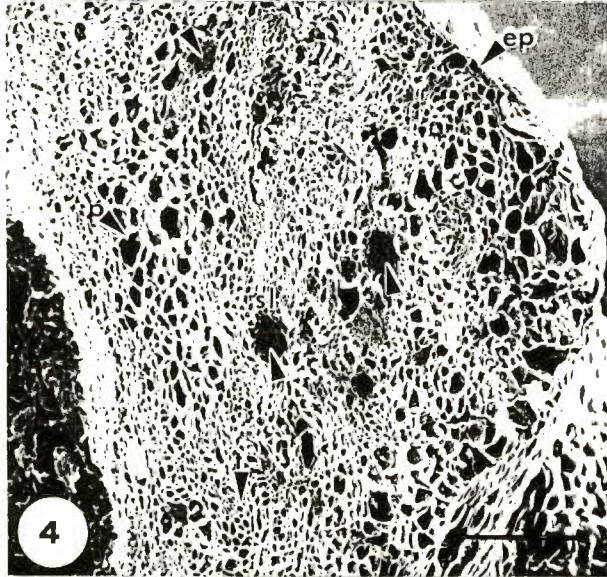
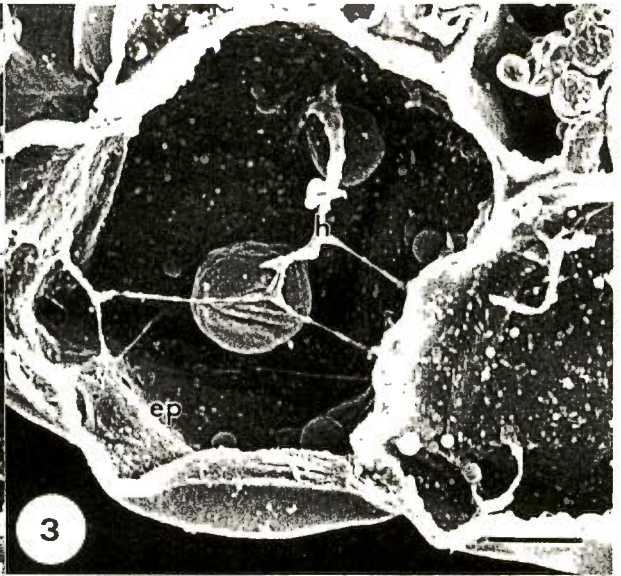
Fig. 5.3 : Intracellulêre hifes in epidermissel van geïnfekteerde mielieblaar, 11 dae na inokulasie. Balkie = 10 μ m.

Fig. 5.4 : Hipertrofie(pyltjie) en hiperplasia(pyltjie) van blaarweefsel tydens galvorming. Fungus begin om slym te vorm (pyltjies). Balkie = 200 μ m.

Fig. 5.5 : Vaatbondel langs galweefsel is georganiseerd, vaatbondel in galweefsel (pyltjie) is gedisorganiseerd. Fungus produseer slym (pyltjie) met aanvang van teliospoor ontwikkeling. Balkie = 100 μ m.

Fig. 5.6 : Met aanvang van teliospoorvorming raak gasheerweefsel gedisorganiseerd en verval en slym word geproduseer. Balkie = 40 μ m.

Fig. 5.7 : Teliospore word in slymmaassa ontwikkel. Sommige van die teliospore is deurgesny, soos gesien by die pyltjie wat die stekels in die teliospoor aandui. Balkie = 4 μ m.

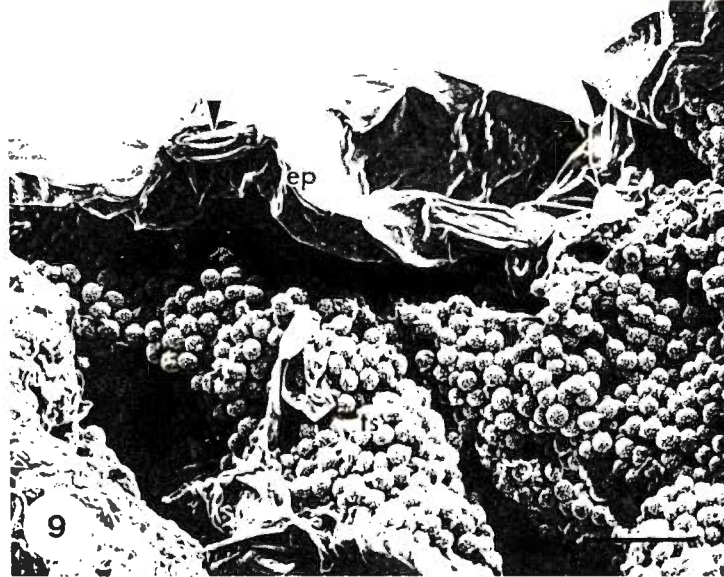
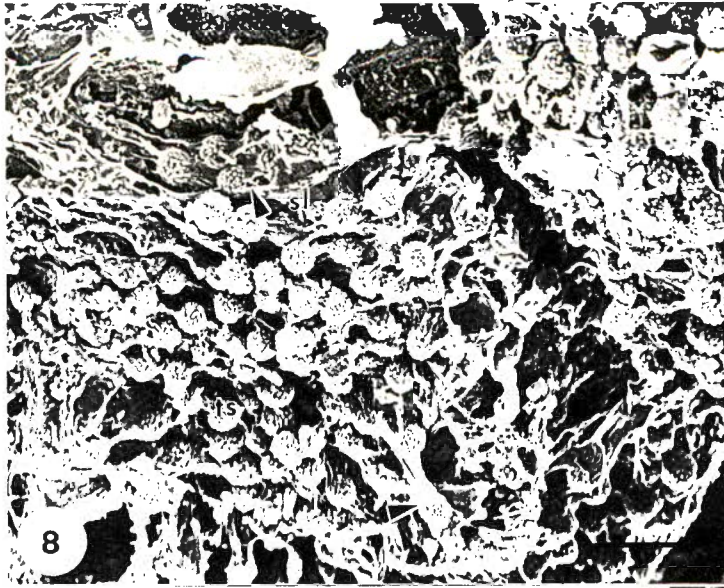


FIGUUR 5.8 - 5.9 : Skandeer elektronmikrograwe van 'n gal van U. maydis op blare van Z. mays.

Simbole : Slym (sl), teliospore (ts), epidermis (ep).

Fig. 5.8 : Teliospore ingebed in slym wat egter besig is om te disintegreer (pyltjies). Balkie = 20µm.

Fig. 5.9 : Epidermisselwand (huidmondjie - pyltjie) vorm omhulsel oor volwasse gal. Balkie = 40µm.



Volgens Mills (1978) kom die teliospore dikwels na skeuring van die galmembraan, nog in bondels voor. Dit kan wees as gevolg van die slym waarin die teliospore gevorm word. (Fig. 5.7) wat nog nie in totaal gedisintegreer of verdroog (Fig. 5.8) het nie.

Ehrlich (1958), het gevind dat die binukleêre vegetatiewe hifes van U. maydis segmenteer om diploïede sporogene selle te vorm, wat dan oorsprong aan die teliospore gee. By U. heufleri breek die selle van hifes op in binukleêre segmente wat oorsprong gee aan die diploïede teliospore (Trione, 1980). By U. striiformis breek die diploïede hife selle op in kort fragmente wat in diploïede teliospore ontwikkel (Trione, 1980). By U. pustulata en U. scabiosae word die brandspore enkel in die segmente gevorm (Deml et al., 1980)

Gasheerfaktore het 'n groot invloed op die ontwikkeling van die vegetatiewe- en die reprodktiewe toestand by baie Ustilago spesie (Trione, 1980). Trione (1980) beweer dat meeste van die Ustilago spesies sistemies in die gasheerplante ontwikkel en dat sporulasie slegs in spesifieke weefsel van die gasheer voorkom. Gesogte weefsel vir sporulasie is die bloeiwyses. Hierdie lokalisering van sporulasie kan wees omdat tydens die reprodktiewe fase van brandfungusse, spesifieke weefsel en stowwe vereis word. Gedurende die vegetatiewe groei van U. maydis kan is daar nie uitwendige sigbare verskille in die morfologie van die gasheerplant waargeneem word nie. Wanneer dit oorgaan tot die reprodktiewe fase, word swart teliospore gevorm en hiermee saam verander die morfologie van dele van die blaarweefsel op die

gasheer in die kenmerkende gal simptome. Ander brandfungusse verander die morfologie van die gasheer en die volgende simptome kan aanwesig wees, suikerriet swepe, verdwering van grashalms, oormatige stingelsuiervorming, brand-geïnduseerde fillodie, hermafroditisme en heterostilie (Fisher & Holton, 1957). Die gasheer beïnvloed nie alleen die voortplantingsfase van die Ustilago spp. patogene nie, maar die patogene beïnvloed ook die reproduksie van die gasheer.

Die volwasse galle van U. maydis word omgewe deur die gasheerepidermis (Fig. 5.3, 5.4, 5.6 & 5.9). Soortgelyke waarnemings is by die galle van U. pustulata gemaak. (Deml et al., 1980). Die volwasse gal van U. maydis bestaan uit 'n massa teliospore (Fig. 5.8). Die gal bars oop wanneer die slym waarin die teliospore gevorm is opdroog en die teliospore vrygestel word (Fig. 5.9). Teliospore kan in dieselfde seisoen weer in gunstige toestande kiem en sporidiums vorm wat 'n vatbare plant kan infekteer.

GEVOLGTREKING :

Tydens die kieming van die teliospore van Ustilago maydis (D.C.) Corda ondergaan die spore metaboliese veranderinge. Die middelste wandlaag van die spore ondergaan opmerklike struktuurverandering met aanvang van kieming. Tydens die kiemstimulering word 'n aaneenlopende laag met die promiselium gevorm wat dui op die ontwikkeling van 'n geënsisteerde promiselium. Dit dui ook op die degradasie van die eksogene teliospoorwand.

Die aanwesigheid van lipieddruppels is 'n opvallende kenmerk in die sitoplasma van teliospore. Dit dui op die reserwemateriale wat gebruik word tydens die ontwikkeling van die promiselium, basidium en sporidiums.

Die monokariotiese, viersellige basidium ontstaan uit die promiselium. Elke sel van die basidium gee oorsprong aan 'n haploïede primêre sporidium. Die sporidiums vermeerder deur 'n gisagtige knopvormende proses. Die sporidiums kiem en penetreer die gasheer hoofsaaklik deur die huidmondjies.

Daar is geen verskille in die ultrastrukturele aspekte van vatbare- en weerstandbiedende mieliecultivars in hierdie ondersoek gevind nie. Die fungus stimuleer die gasheer tot hipertrofie en hiperplasia tydens galvorming. Hormone is dus waarskynlik betrokke by die ontwikkeling van die fungus in die gasheer.

Galvorming word voorafgegaan deur die produksie van slym in die gasheerweefsel. Daar bestaan 'n interaksie tussen die gasheer en

die patogeen, aangesien gasheerweefsel eers gedisorganideerd raak tydens galvorming wat hipertrofie, hiperplasia en slymproduksie inhou.

U. maydis teliospore word in die slym gevorm. Die slym dien as beskerming en moontlik as voeding vir die ontwikkelende teliospore. Die slym disintegreer met rypwording van die gal. Tydens die oopbars van die gasheerepidermis wat 'n onhulsel vorm oor die gal, word die teliospore vrygestel. Die teliospore het nie 'n rusperiode nodig voordat dit 'n vatbare gasheer infekteer nie. Herhaalde blaasbrand infeksie van plante kan dus in dieselfde seisoen plaasvind.

Gelyktydig met ultrastrukturele veranderinge vind fisiologiese verandering in U. maydis geïnfekteerde Z. mays plante plaas. Ultrastruktureel kom chloroplas disorganisasie 11 dae na infeksie voor. Chlorofilfluoressensie-toetse wys egter dat die fotosintese-apparaat na 11 dae fisiologies verval het maar dat daar reeds vroeër funksionele afwykings plaasvind.

Chlorofilfluoressensie-toetse kan van groot belang vir die Landboubedryf wees, aangesien plantbeskadiging aangetoon kan word (tot soveel as 19 dae), voordat enige makroskopiese simptome sigbaar is.

LITERATUURLYS :

AINSWORTH, G.C. 1965. Ustilago maydis. (C.M.I. Description of pathogenic fungi and bacteria. Kew : Commonwealth Mycological Institute. Set 8 Sheet No. 79.)

AINSWORTH, G.C. 1971. Dictionary of the fungi. 6th ed. Kew : Commonwealth Mycological Institute. 663p.

ALLEN, J.V., HESS, W.M. & WEBER, D.J. 1971. Ultrastructural investigations of dormant Tilletia caries teliospores. Mycologia, 63:144-155.

BILLET, E.E. & BURNETT, J.H. 1978a. The host-parasite physiology of the maize smut fungus, Ustilago maydis. I. The effect of smut infection on maize growth. Physiological plant pathology, 12:93-102.

BILLET, E.E. & BURNETT, J.H. 1978b. The host-parasite physiology of the maize smut fungus, Ustilago maydis. II. Translocation of ¹⁴C-labelled assimilates in smutted plants. Physiological plant pathology, 12:103-112.

BOWMAN, D.H. 1946. Sporidial fusion in Ustilago maydis. Journal of agricultural research, 72:233-243.

- BUCHANAN, B.B., HUTCHESON, S.W., MAGYAROSY, A.C. & MONTALBINI, P. 1981. Photosynthesis in healthy and diseased plants. (In Ayres, P.G. Effects of disease on the physiology of the growing plant. New York : Cambridge University. p.13-28.)
- BULLOCK, G.R. 1984. The current status of fixation for microscopy : a review. Journal of microscopy, 133: 1-15.
- CHRISTENSEN, J.J. 1963. Corn smut caused by Ustilago maydis. St. Paul, Minn. : American Phytopathological Society. 41p. (American Phytopathological Society. Monograph, No. 2.)
- DEKHUIJZEN, H.M. 1976. Endogenous cytokinins in healthy and diseased plants. Physiological plant pathology, 4:526-559.
- DEML, G, NEBEL, M. & OBERWINKLER, F. 1980. Light and scanning electron microscopic studies of spore formation in Ustilago pustulata and U. scabiosae. Canadian journal of botany, 59(2):122-128.
- EHRlich, H.G. 1958. Nuclear behavior in mycelium of a solopathogenic line and in a cross of two haploid lines of Ustilago maydis (DC.) Cda. Mycologia, 50:622-627.
- EHRlich, H.G. & EHRlich, M.A. 1963. Electron microscopy of the sheath surrounding the haustorium of Erysiphe graminis. Phytopathology, 53:1378-1380.
- FAHN, A. 1985. Plant anatomy. Oxford : Pergamon . 544p.

- FINERAN, B.A. & FINERAN, J.M. 1984. Teliospores of Enthorrhiza casparyana (Ustilaginales): a correlated thin-sectioning and freeze-fracture study of endogenously dormant spores. Canadian journal of botany, 62:2525-2539.
- FISHER, G.W. & HOLTON, C.S. 1957. Biology and control of the smut fungi. New York : Ronald Press 662p.
- GARDNER, J.S., ALLEN, J.V. & HESS, W.M. 1983. Sheath structure of Tilletia indica teliospores. Mycologia, 75:333-336.
- HANNA, W.F. 1929. Studies in the physiology and cytology of Ustilago zaeae and Sorosporium reilianum. Phytopathology, 19:415-442.
- IMMER, F. R. & CHRISTENSEN, J.J. 1931. Further studies on reaction of corn smut and effect of smut on yield. Phytopathology, 21:661-674.
- INGOLD, C.T. 1983. The basidium in Ustilago. Transactions of the British Mycological Society, 81:573-584.
- MENNEGA, R, NEL, P.C. & LeCOURT DE BILLOT, M.R. 1990. Chlorofilfluoresensie as tegniek vir die opsporing van residuele atrasien in grond. Applied plant science, 4:84-85.
- MILLS, L.J. 1978. Epidemiologie en Blaasbrand (Ustilago maydis (D.C.) Corda) by mielies. Pretoria. 218p. (Proefskrif (D.Sc. Agric.) - UP.)

- MILTHORPE, F.L. & MOORBY, J. 1969. Vascular transport and its significance in plant growth. Annual review of plant physiology, 20:117-136.
- MONTALBINI, P., BUCHANAN, B.B. & HUTCHESON, S.W. 1981. Effect of rust infection on rates of photochemical polyphenol oxidation and latent polyphenol oxidase activity of Vicia faba chloroplast membranes. Physiological plant pathology, 18:51-57.
- MOORE, R.T. 1972. Ustomycota, a new division of higher fungi. Antonie van Leeuwenhoek. Journal of microbiology and serology, 38:567-584.
- 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.
- NAWAZ, M.S. & HESS, W.M. 1987. Ultrastructure of Neovossia horrida teliospores. Mycologia, 79:173-179.
- OH, J.K. & HESS, W.M. 1982. Unidentified organelles and vacuoles in Tilletia teliospores. Mycologia, 74:1032-1037.
- PAINE, W.A. & HESS, W.M. 1984. Ultrastructure of germinating sugarcane smut (Ustilago scitaminea) teliospores. Transactions of the British Mycological Society, 82:385-395.
- PEGG, G.F. 1976. Endogenous auxins in healthy and diseased plants. Physiological plant pathology, 4:560-581.

- RAMBERG, J. E. & McLAUGHLIN, D. J. 1980. Ultrastructural study of promycelial development and basidiospore initiation in Ustilago maydis. Canadian journal of botany, 58:1548-1561.
- 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.
- ROBB, J. 1972. Ultrastructure of Ustilago hordei (Pers.) Lagerh. II. Septation in the metabasidium. Canadian journal of botany, 14:839-849.
- ROBERTS, D.A. & BOOTHROYD, C.W. 1972. Fundamentals of Plant Pathology. San Francisco, Calif. : Freeman. 392p.
- SAMUELSSON, G. & ÖQUIST, G. 1977. A method for studying photosynthetic capacities of unicellular algae based on in vivo chlorophyll fluorescence. Physiologia Plantarum, 40:315-319.
- SHAW, D.R., PEEPER, T.F. & NOFZIGER, D.L. 1985. Comparison of chlorophyll fluorescence and fresh weight herbicide bioassay techniques. Weed science, 33:29-33.
- SHAW, M. & MANOCHA, M.S. 1965. The physiology of host-parasite relations. XV. Fine structure in rust infected wheat leaves. Canadian journal of botany, 43:1285-1292.
- SLUSHER, R.L., HAAS, D.C., CAROTHERS, Z.B. & SINCLAIR, J.B. 1974. Ultrastructure at the host-parasite interface of Phytophthora megasperma var. sojae in soybean rootlets. Phytopathology, 64:834-840.

SMILLIE, P.M. & HETHERINGTON, S.E. 1983. Stress tolerance and stress-induced injury in crop plants measured by chlorophyll fluorescence in vivo. Physiologia Plantarum, 72:1043-1050.

SPURR, A.R. 1969. A low viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. Journal of ultrastructural research, 26:31-34.

STAVELY, J.R., PILLAI, A. & HANSON, E.W. 1969. Electronmicroscopy of the development of Erysiphe polygoni in resistant and susceptible Trifolium pratense. Phytopathology, 59:1688-1693.

TIEDT, L.R., JOOSTE, W.J. & HAMILTON-ATTWELL, V.L. 1987. Technique for preserving aerial fungus structures for scanning electron microscopy. Transactions of the British Mycological Society, 88:420-422.

TODD, W.J. 1986. Effects of specimen preparation on the apparent ultrastructure of microorganisms. (In Aldrich, H.C & Todd, W.J., eds. Ultrastructure techniques for microorganisms. New York : Plenum. p.87-100.)

TRIONE, E.J. 1980. Teliospore formation by Ustilago scitaminea in sugarcane. Phytopathology, 70:513-516.

VAN DYKE, G.C. & HOOKER, A.L. 1969. Ultrastructure of host and parasite in interaction of Zea mays with Puccinia sorghii. Phytopathology, 59:1934-1946.

WILLIAMS, P.H. & YUKAWA, Y.B. 1967. Ultrastructural studies on the host-parasite relations of Plasmodiophora brassicae. Phytopathology, 57:682-687.