

TECNISCH UNIVERSITAET  
BOTANISCHES INSTITUT



ENTWICKLUNG CYTOLOGISCHER UND BIOCHEMISCHER KRITERIEN ZUR SELEKTION  
RESISTENTER HEVEAPFLANZEN GEGEN *MICROCYCLUS ULEI*

LIEBEREI, R.  
JUNQUEIRA, N.T.V.

BRAUNSCHWEIG

1987

Entwicklung Cytologischer ...  
1987 FL-FOL4041



CPAA-1618-1

FOL  
4041



"Entwicklung cytologischer und biochemischer Kriterien zur Selektion resistenter Heveapflanzen gegen *Microcyclus ulei*."

1 Einleitung

In dem DFG/GTZ Projekt ist in Kooperation mit Herrn Dr. K.H. Chee aus dem Rubber Research Institute of Malaysia (RRIM), Herrn Dr. N.T.V. Junqueira aus dem Centro Nacional de Pesquisa da Seringueira e Dende (CNPDS), Manaus, Amazonas, Brasilien, und unserer Gruppe eine grundsätzliche Basis für das Verständnis des Wirt-Pathogen Systems Hevea sp.-*Microcyclus ulei* entstanden.

Die Arbeiten von Herrn Dr. Junqueira (Publ. 18, 19, 20, 21, 22) sowie von Herrn Dr. Chee (Publ. 2, 23) führten zur Erfassung physiologischer Rassen des Schadpilzes. Während Herr Dr. Chee und Mitarbeiter mit frisch gesammelten Sporen an Blattscheibentests arbeiteten (Publ. 23), hat Herr Dr. Junqueira (Publ. 18) ein definiertes Sortiment an axenischen Kulturen von *M. ulei* Isolaten aus allen Kautschukanbauregionen Brasiliens erstellt. Dieses Sortiment wird zur Untersuchung definierter Wirt-Pathogen Wechselwirkungen eingesetzt und bietet für unsere Arbeiten erstmals den Ansatz, Kombination und Vererbung von Resistenzfaktoren in definierten Klonen zu analysieren.

Seit März 1987 arbeitet Herr Dr. Junqueira im Rahmen eines Gastforschungsaufenthaltes in unserer Arbeitsgruppe in Braunschweig. Ziel ist es, die ermittelten Daten zur Physiologie der Wirt-Pathogen Wechselwirkung, wie sie in unserem Labor in Braunschweig ermittelt wurden, mit den Daten von Herrn Dr. Junqueira zu kombinieren.

Aufgrund einer drastischen Änderung der Landwirtschaftspolitik zum Kautschukanbau in den feuchten Tropen Brasiliens sind die Zielsetzungen unseres Programmes, die grundsätzlichen Resistenzfaktoren von Hevea zu erarbeiten, zu zentraler Bedeutung gelangt (kurze Ausführung dazu im nachzureichenden Folgeantrag zu DFG Li 238/2-4).

Im vorliegenden Berichtszeitraum sind 9 Veröffentlichungen publiziert worden, darunter 3 Posterzusammenfassungen. 4 Manuskripte sind im Druck

bzw. als Manuskript vorgelegt. 2 Dissertationen und 2 Diplomarbeiten sind abgeschlossen worden (Publ. 6, 7, 8, 10). (Siehe dazu die Liste der Publikationen, S. 14)

## 2 Ergebnisse

### 2.1 Wirt-Pathogen Kombination

2.1.1 Ebenen der Wirt-Pathogen Wechselwirkung; resistenzwirksame Faktoren

2.1.2 Rassen des Pathogens

2.1.3 Artenspezifische Resistenz bei Hevea spezie

### 2.2 Praedisposition des Wirtes

2.2.1 Blattalter

2.2.2 Klonale Unterschiede der Blattanfälligkeitsphasen

2.2.3 Blattflächenreduktion

### 2.3 Faktoren der Cyanogenese

### 2.4 Praeformierte Abwehrfaktoren und Phytoalexine

### 2.5 Resistenzinduktion

### 2.6 Strukturuntersuchungen

### 2.1 Wirt-Pathogen Kombination

#### 2.1.1 Ebenen der Wirt-Pathogen Wechselwirkung

Durch Kombination der Daten von Giesemann (Publ. 7), und Junqueira (Publ. 18) mit fluoreszenzmikroskopischen Studien lassen sich sechs Ebenen in der Wechselwirkung unterscheiden, auf denen resistenzwirksame Faktoren zum tragen kommen.

#### 1. Prae-Penetrationsphase

Wässrig extrahierbare Substanzen der Blattoberfläche beeinflussen die Keimschlauchentwicklung, nicht aber das Auskeimen der Konidien. Substanzen der Blattoberflächen resistenter Pflanzen bewirken, daß kurze, gestauchte Keimschläuche ausgebildet werden, die Anzahl der Keimschlauchverzweigungen gegenüber in Wasser gekeimten Kontrollen gemindert und der prozentuale Anteil der Keimschläuche mit Appressorien erhöht ist.



## 2. Penetration

Hochresistente Klone reagieren zunächst mit der Ausbildung chlorotischer Flecken von weniger als 1 mm Durchmesser. Innerhalb von zwei Tagen nach Inokulation treten nekrotische Bereiche bis zu einer maximalen Größe von 2 mm auf. Offenbar dringt der Schadpilz in die Epidermiszellige ein, wird aber im Zuge einer hypersensitiven Reaktion abgewehrt. Fluoreszenzmikroskopisch lassen sich im Zuge der Abwehr stark blaufluoreszierende Substanzen inter- und intrazellulär nachweisen. Diese Substanzen werden offenbar metabolisiert. Ca. zwei Tage nach dem ersten Auftreten ist die intrazelluläre Blaufluoreszenz nicht mehr deutlich sichtbar, statt dessen setzt die Bildung (bei Blauanregung) gelbfluoreszierender Komponenten im Zellwandbereich ein.

## 3. Interzelluläre Ausbreitung des Pilzmycels entlang der Leitbündel

Die Hyphen von *M. ulmi* treten nach erfolgter Penetration rasch in die Leitbündelregion des Blattes ein und wachsen parallel zu den Leitbündeln (Publ. 7). Bei jungen Blättern sind die Leitbündel zum Zeitpunkt der Infektion noch im Wachstum begriffen. Die Ausbreitung der Hyphen entlang der Leitbündel ist ein bestimmender Schritt für die spätere Größe der Läsionen.

Nach den Untersuchungen von Junqueira (Publ. 18) sind durch Auswahl entsprechender Rassen-Wirtsklon-Kombinationen stets reproduzierbar kleine oder große Läsionen erzielbar. Nach Grundlage der Daten von Giesemann (Publ. 7) ist sehr wahrscheinlich, daß die Ausbreitung des Pathogens im Blatt in dieser frühen Besiedelungsphase durch pflanzliche Resistenzfaktoren beeinflusst ist, die das Wachstum der Hyphen entlang der Leitbündel kontrollieren.

## 4. Verzweigungshemmung

Zur Produktion von Konidiophoren bilden die entlang der Leitbündel wachsenden Hyphen Verzweigungen aus. Diese Verzweigungen sind in einigen Klonen offensichtlich nicht möglich. Charakteristisch für Blätter dieser Klone ist, daß chlorotische Blattbereiche auftreten, die Gewebenekrotisierung und die Sporenbildung jedoch unterbleiben.

## 5. Sporulation

Die Sporenproduktion ist bei gleicher Läsionengröße auf Blättern verschiedener Klone sehr unterschiedlich. Junqueira (Publ. 18) hat diesen Aspekt mit unterschiedlichsten Kombinationen von Wirtsklonen und Pathogenisolaten untersucht. Fluoreszenzmikroskopisch lassen sich in Pflanzen mit kleinen Läsionen und gezeigter Sporenproduktion bei Durchbrechen der Konidiophoren durch das Blattmesophyll sowohl die unter 2) genannte Blaufluoreszenz als auch später die entsprechende Gelbfluoreszenz nachweisen. Demnach ist zu vermuten, daß in diesen Pflanzen zum Zeitpunkt des Konidiophorendurchbruchs exakt dieselben Reaktionen hervorgerufen werden, wie sie bei teilresistenten Pflanzen bereits während der Abwehrreaktion bei Eindringen der Penetrationshyphe sichtbar werden.

## 6. Ausbildung von Stroma und sexueller Phase

In einigen Wirt-Pathogen-Kombinationen unterbleibt nach Konidiosporenproduktion die Stromaentwicklung. Wie diese späte Kontrolle der Pathogenentwicklung zustandekommt, ist ungeklärt. Da in den Stromata die langlebigen Ascosporen gebildet werden und durch Unterdrückung dieser Stromatabildung diese Lebensphase des Pathogens unterbunden wird, kann diesem Phänomen eine erhebliche epidemiologische Bedeutung zukommen. Zur Bewertung dieser Komponente fehlen jedoch noch wesentliche Informationen.



### 2.1.2 Rassen des Pathogens

In den in Bahia durchgeführten Studien wurden unter Verwendung eines von Chee (Publ. 21) entwickelten Blattscheibentests insgesamt 9 Pathogenrassen differenziert. Diese Differenzierung nach Chee erfaßt wegen der begrenzten Einsetzbarkeit des Blattscheibentests lediglich die Punkte 1), 2) und 3) der oben genannten Wechselwirkungen zwischen Pilz und Pflanze. Junqueira hat in einem weitergehenden Test an jungen Pflanzen mit einer aus ganz Brasilien zusammengestellten Isolatesammlung Rassentests durchgeführt und die Isolate in vier Gruppen eingeordnet, die sich hinsichtlich ihrer Virulenz gegenüber Heveaarten unterscheiden:

- Gruppe I : Isolate von *M. ulei*, die virulent sind auf *H. benthamiana* Varietäten und deren interspezifischen Hybriden, nicht jedoch auf *H. brasiliensis*.
- Gruppe II : Isolate von *M. ulei*, die virulent sind auf *H. brasiliensis* und interspezifischen Hybriden außer mit *H. benthamiana*.
- Gruppe III: Isolate, die sowohl *H. benthamiana* als auch *H. brasiliensis*-Varietäten befallen (mit variierendem Wirtsspektrum bei den unterschiedlichen Isolaten).
- Gruppe IV : nicht virulente Isolate.

Nach den Daten von Darmono und Chee (Publ. 23) lassen sich die Rassen 2, 3 und 8 in die Gruppe I, die Rassen 4, 5, 6, 7, 9 in Gruppe II und die Rasse 1 in Gruppe IV nach Junqueira (Publ. 18) einordnen. Eine endgültige Überprüfung dieser Einordnung ist jedoch nur nach Untersuchung der beschriebenen Rassen in dem experimentellen Ansatz von Junqueira (Publ. 18) möglich, da die Einordnung nach Rassen durch Darmono und Chee (Publ. 23) unter Verwendung eines Blattscheibentests durchgeführt wurde, in dem die pflanzliche Reaktion nur teilweise erfaßt wird (s.o.).

Interessanterweise treten in der Gruppierung nach Junqueira (Publ. 18) einige Ausnahmen auf: z.B. lassen sich die *Hevea brasiliensis* Klone RRIM 600 und GT 1 von *M. ulei* Isolaten aus allen drei virulenten Gruppen infizieren. Beide Klone sind hochproduzierende orientalische Klone, die ausgewiesen sind durch hohe HCN-Freisetzung bei Infektion. Es liegt sehr nahe -und konnte für RRIM 600 nachgewiesen werden (Publ. 3, 7, 15)-, daß die potentiell vorhandenen Abwehrmechanismen dieser Pflanzen nicht ablaufen, da sie durch HCN unterdrückt werden (siehe 2.3).

## 2.2 Praedisposition des Wirtes

### 2.2.1 Blattalter

*Hevea*-Arten weisen eine ausgeprägte Altersresistenz der Blätter auf. Blätter ab ca 15. Tagen Blattalter sind resistent gegen den Befall mit jeglichen Blattschadpilzen.

Infektion junger Blätter von 1 bis 3 Tagen Blattalter bewirkt bei 90 % der befallenen Blätter Blattfall. Dagegen fallen bei einem Blattalter von 4 bis 7 Tagen inokulierte Blätter nur zu 65 % ab und bei einem Blattalter von 8 bis 10 Tagen inokulierte Blätter sogar nur noch zu 10 % (Tabelle 1, Publ. 2). Der Einfluß der Sporendichte pro Blattfläche auf den Blattfall ist noch nicht untersucht. Aus Vorversuchen ist lediglich bekannt, daß mit steigender Sporendichte pro Blattfläche der Durchmesser der Läsionen zurückgeht.

### 2.2.2 Klonale Unterschiede in der Blattaltersresistenz

Blätter von *Hevea species* weisen eine Altersresistenz auf. Mit zunehmender Blattrifung geht die Anfälligkeit der Blätter gegen Pilzinfektionen zurück. Ausgereifte Blätter sind resistent gegen Schadpilzbefall. In einer grundsätzlichen Studie wurde die Blattanfälligkeitsphase unterschiedlicher Heveaklone ermittelt (Tabelle 2.2.2.1).

### 2.2.3 Blattflächenreduktion

In einer gemeinsamen Studie mit der Arbeitsgruppe von Dr. Chee ( Publ. 2) konnte zudem gezeigt werden, daß Befall mit *M. ulei* eine erhebliche Verringerung von ca. 30% der Blattfläche hervorruft. Sofern durch Pilzbefall also kein Blattabwurf ausgelöst wird, führt allein die Reduktion der Blattfläche zu einer Verringerung der photosynthetisch aktiven Fläche. Diese Reduktion ist besonders stark ausgeprägt bei Blättern, die in sehr jungen Entwicklungsstadien befallen werden.

Tab. 2.2.2.1.: Einfluß des Blattalters auf Infektion und Schadpilzentwicklung

Hevea-klone	Anfälligkeitsdauer der Blätter (Tage)	Generationsdauer (Tage)	mögliche Anzahl der Pilzgenerationen je Blattschub	mittlerer Durchmesser der Läsionen (mm)	Sporenproduktion in den Läsionen
Fx 3925	16	5,0	3	3,4	Sehr hoch
Fx 3864	16	6,5	3	3,0	Sehr hoch
IAN 873	16	5,5	3	3,2	Sehr hoch
Fx 3899	15	6,0	3	3,2	Sehr hoch
IAN 717	15	5,5	3	3,7	Sehr hoch
Fx 985	14	6,5	2	3,3	Sehr hoch
Fx 4098	12	8,0	2	2,2	Hoch
IAN 6323	12	5,5	2	3,6	Sehr hoch
CNS AM 7665	10	8,5	1	2,8	Niedrig
CNS AM 7907	10	10,0	1	1,5	Niedrig
IAN 6158	9	7,5	1	1,8	Mittel

Legende zu Tab. 2.2.2.1:

Anzahl der möglichen Pilzgenerationen: Anfälligkeitsdauer der Blätter geteilt durch die Generationsdauer  
 Sporenproduktion: Sehr hoch: Sporulation sowohl auf der Blattunterseite als auch auf der Blattoberseite sehr hoch  
Hoch: Sporulation hoch und nur auf der Blattunterseite  
Mittel: Sporulation niedrig und nur auf der Blattunterseite  
Niedrig: Sporulation niedrig und nur am Rand der Läsionen auf der Blattunterseite  
 Generationsdauer von *M. ulei*: Zeitraum von Inokulation bis zur Produktion von Sporen in mehr als 50 % der sichtbaren Läsionen

Aus dieser Tabelle ergibt sich klar, daß die Blattanfälligkeitsphase in unterschiedlichen Klonen sehr stark variiert. Darüberhinaus ist auch die Entwicklungsphase von *M. ulei* in Blättern unterschiedlicher Klone unterschiedlich lang. Nach den bislang vorliegenden Daten ist eine kurze Blattanfälligkeitsphase mit einer langen Pilzgenerationszeit gekoppelt. Diese Kombination von Blatteigenschaft und Pathogenentwicklung ist epidemiologisch äußerst wichtig, denn auf Blättern mit kurzer Blattanfälligkeitsphase und langer Pilzgenerationszeit können nur in sehr begrenztem Maße Sporen gebildet werden, d.h. der Aufbau eines Inokulums ist in solchen Wirt-Pathogen-Kombinationen äußerst begrenzt. Für das weitere Programm ist erforderlich, einerseits die Pilzgenerationszeiten der unterschiedlichen *M. ulei* Isolate auf ausgesuchten Klonen zu erfassen, andererseits die Faktoren zu erfassen, auf denen die Altersresistenz der Blätter beruht. Diese Faktoren sollen, wenn geeignet, in die Selektionsmethodik integriert werden.

### 2.3 Faktoren der Cyanogenese

(Publ. 1,3,4,6,7,9,11,12,13)

Die pflanzliche Cyanogenese wird durch viele Faktoren reguliert (Abbildung 1, Publ. 11). In den Studien zur HCN-Freisetzung konnte von Selmar (Publ. 9) nachgewiesen werden, daß insbesondere der Geschwindigkeit der HCN-Freisetzung eine grundsätzliche Bedeutung für die Hemmwirkung von HCN in befallenen Geweben zukommt. In Modellstudien konnte gezeigt werden (Publ. 14), daß die HCN-Freisetzung aus Heveageweben bei Gegenwart der Hydroxynitril-Lyase (HN) um den Faktor 26 erhöht wird. Die Minderung des HCN-Gehaltes des Gewebes ist über Metabolisierung der Blausäure durch  $\beta$ -Cyanoalaninsynthase ( $\beta$ -CAS) katalysiert (Blumenthal et al. 1968, J. Biol. Chem., 243: 5302-5307). Die  $\beta$ -CAS in Hevea wurde im Rahmen einer Diplomarbeit untersucht (Publ. 6). In dieser detaillierten Studie zur HCN-Metabolisierung wird grundsätzlich klar, daß eine Entgiftung des HCN über die  $\beta$ -CAS in Hevea aus enzymkinetischen Gründen nahezu ausgeschlossen werden kann:

Das Substrat der  $\beta$ -CAS ist nach der Studie von Mevenkamp (Publ. 6) das undissoziierte HCN, der optimale pH-Bereich der Enzymaktivität liegt weit im alkalischen. Überträgt man diese an teilgereinigten Enzymfraktionen gewonnenen Daten auf die pflanzlichen Gewebe, so kommt man zu dem Schluß, daß selbst nach vollständiger Spaltung der cyanogenen Glycoside (Publ. 1,3) und sofortiger Überführung des entstandenen Cyanohydrins in Carbonyl und HCN (Publ. 6) das Substrat drastisch im Unterschluß vorliegt. Erklärungsansätze für diese Befunde werden von Mevenkamp (Publ. 6) diskutiert. Weitere Versuche unter Ausschluß möglicher artefizieller, durch die Enzymreinigung bedingter Veränderung der  $\beta$ -CAS sind wünschenswert.

Im vorliegenden Arbeitsabschnitt ergab sich eindeutig, daß cyanogene Glycoside und daraus freisetzbare Blausäure bei hochcyanogenen Pflanzen mit schneller HCN-Freisetzung einen Anfälligkeitsfaktor darstellt, der die potentiell vorhandenen aktiven Abwehrmechanismen unterbindet (Publ. 7,11,15).

Inwieweit eine Korrelation von Gehalt an Cyanglycosid und Ertrag, wie für Maniok und Kautschuk oft formuliert wurde, wirklich besteht, ist zu überprüfen. Sofern eine Korrelation zwischen hohem Gehalt an cyanogenem Glycosid und hoher Latexproduktion besteht (wie aus den hochcyanogenen, hochproduktiven malaysischen Klonen abgeleitet werden könnte) liegt eine wesentliche Selektionsarbeit in der Ermittlung solcher Heveaklone, die ein hohes HCN-Potential haben (also einen hohen Gehalt an cyanogenen Vorstufen), jedoch eine geringe HCN-Kapazität aufweisen (Publ. 11) (also eine verminderte HCN-Freisetzung zeigen, da entweder die Hydroxynitril-Lyaseaktivität gering ist und/oder eine hohe HCN-Refixierungsaktivität vorliegt). Die brasilianischen Kooperationspartner sind äußerst interessiert, die neuen Selektionen und Kreuzungen in dieser Hinsicht zu testen.

2.4 Praeformierte Abwehrstoffe und Phytoalexine  
(Publ. 5,7,10)

In Hevea werden im Zuge der Resistenzreaktion der Blätter gegen Pilzbefall mindestens zwei fungitoxische Substanzen gebildet, von denen eine die blaufluoreszierende Substanz Scopoletin ist (Publ. 5,10). Die zweite induzierte Substanz ist wesentlich unpolarer als Scopoletin. Der stoffliche Charakter dieser Substanz ist noch ungeklärt. Zusätzlich zu diesen fungitoxischen Substanzen liegen in Hevea unabhängig von jeder Infektion zwei weitere, praeformierte fungitoxische Komponenten vor, deren Bedeutung bislang noch nicht untersucht ist. Die Bildung von Scopoletin und dessen Überführung in das korrespondierende Glucosid Scopolin ist z.Zt. in Untersuchung (Publ.10).

## 2.6 Strukturelle Untersuchungen

2.6.1 In elektronenoptischen Studien lassen sich klare Unterschiede in der Epidermisoberflächenbeschaffenheit unterschiedlicher Heveaarten erkennen. Diese Merkmale sind offensichtlich als strukturelle Marker für die systematische Einordnung selektionierten Wildmaterials geeignet, wie sie für die jetzige Arbeit in Brasilien benötigt wird. Für die Erkennung artspezifischer Resistenzunterschiede von Hevea gegen *M. ulei* sind diese Strukturmerkmale jedoch nicht geeignet. Ein Manuskript ist in Vorbereitung.

### 2.6.2 Fluoreszenzmikroskopische Studien

1. In nicht infizierten Blättern und in nicht befallenen Bereichen infizierter Blätter treten in der epicuticulären Wachsschicht blaufluoreszierende Komponenten auf (Abb. 1); in den interzellulären Gewebebereichen und innerhalb der Zellen ist keine Blaufluoreszenz nachweisbar.

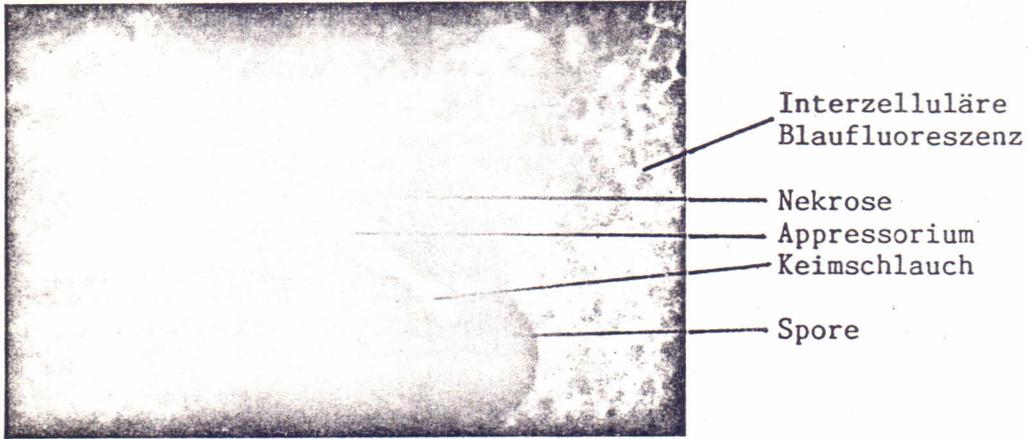
Abb. 1: Blaufluoreszenz von Oberflächenstrukturen nicht infizierter Heveablätter (UV-Anregung)



epicuticuläre  
Wachsschicht

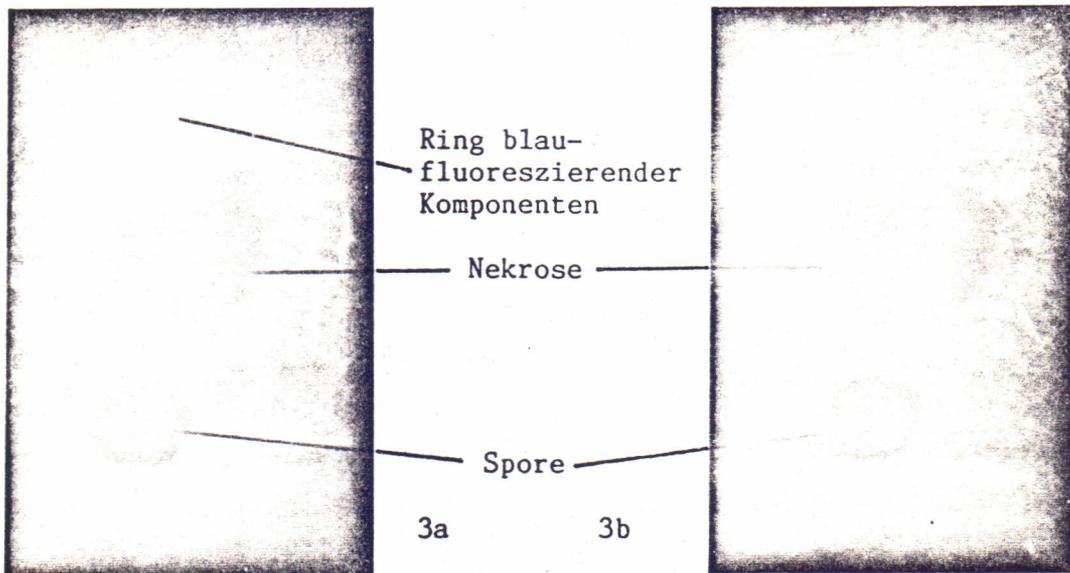
2. In inokulierten Blattbereichen tritt sehr früh, bereits ab 6 Stunden nach Inokulation mit *Microcyclus ulei*-Sporen, eine Blaufluoreszenz auf. Die blaufluoreszierenden Substanzen sind am Ort der Appressorien- und Penetrationshyphenbildung lokalisiert und akkumuliert (Publ.. 5, 7). Werden junge Blätter von Hevea species mit Sporen des für Hevea schwachen Blattpathogens *Periconia manihoticola* beimpft, so tritt innerhalb von 24 Stunden nach Inokulation eine hypersensitive Gewebenekrose an der Eindringstelle des Pilzes auf (Abb. 2).

Abb. 2: Hypersensitive Gewebenekrose, 24 Stunden nach Inokulation mit Periconia manihoticola, auf den fluoreszierenden Keimschlauch fokussiert (UV-Anregung)



Um die nekrotischen Zellbereiche herum wird ein Ring blaufluoreszierender Komponenten ausgebildet (Abb. 3a, 3b). Diese fluoreszierenden Komponenten treten in den Interzellularbereichen auf und folgen nicht der Struktur der epicuticulären Zellwandauflagerungen. In Abb. 3b ist der identische Infektionsbereich statt bei Anregung mit UV-Licht (Abb. 3a) bei Anregung mit Blaulicht dargestellt. Die gesamte chlorophyllhaltige Blattfläche erscheint in Rotfluoreszenz, es treten hier keine Anzeichen für eine Gelbfluoreszenz auf, wie sie in den späteren Befallsstadien in Heveablättern korreliert zu Abwehrreaktionen beobachtet wird.

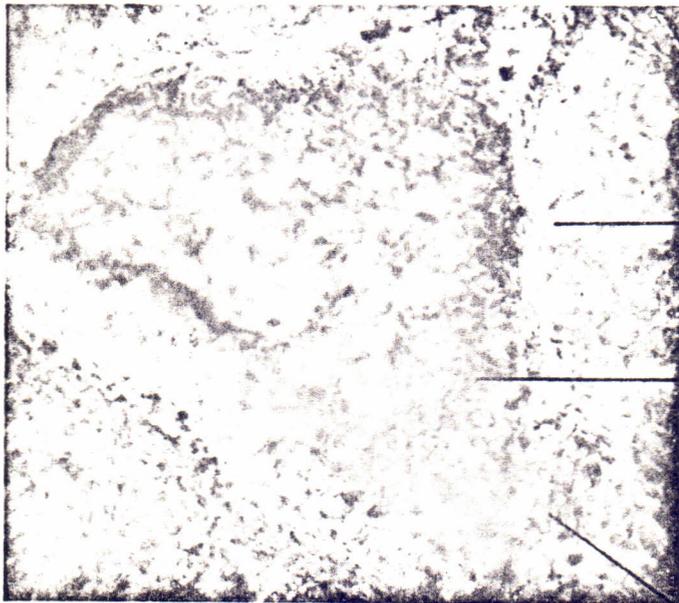
Abb. 3: Aufsicht auf eine nekrotisierte Penetrationsstelle von Periconia manihoticola (a: UV-Anregung, b: Blauanregung)



3. In teilresistenten Heveaklonen reagieren die Blätter auf Infektion mit *Microcyclus ulei* mit Nekrosebildung. Es findet nur sehr vereinzelt Sporenproduktion statt. In Abb. 4a und 4b sind die fluoreszenzmikroskopischen Aspekte dieser Reaktion dargestellt. Die makroskopisch sichtbaren Nekrosen treten hier 6 Tage nach Inokulation auf. Nur in den Randbereichen der Läsionen ist eine geringe Sporenproduktion zu beobachten. Bei UV-Anregung tritt eine über sehr weite Gewebezonen verbreitete hellblaue Fluoreszenz auf. Bei Anregung mit Blaulicht wird eine starke gelbfluoreszierende Zone um die nekrotische Läsion herum sichtbar. Auch die nichtnekrotischen Randbereiche, in denen vereinzelt Konidiophoren durch das Gewebe treten, weisen diese Gelbfluoreszenz auf.

Abb. 4: Läsion auf einem Blatt eines teilresistenten Heveaklones 6 Tage nach Inokulation mit *Microcyclus ulei*

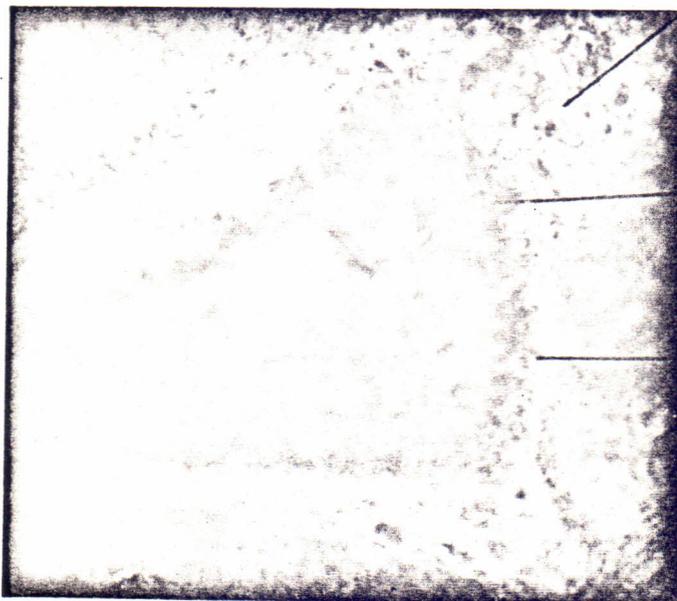
4a: UV-Anregung



Randbereich der Läsion

Nekrose

4b: Blauanregung



Sporenbildungsbereich

Nekrose

Gelbfluoreszierender Bereich

4. In kompatiblen Wirt-Pathogen Kombinationen unterbleibt in den inokulierten, infizierten Blättern jegliche nekrotische Reaktion. Nach anfänglichem, schwachen Auftreten der blafluoreszierenden Komponenten im Interzellularbereich, ähnlich wie bei Abb. 3a (ca. 24 Stunden nach Inokulation), treten 6 Tage nach Infektion an den Durchbruchstellen der Konidiophoren blafluoreszierende Komponenten innerhalb der Zellen auf, die die Konidiophoren umgeben (s. Abb. 5a, b, c). In Abb. 5b ist im Randbereich beginnende Gelbfluoreszenz zu beobachten. An dieser Stelle setzt eine Gewebeerstörung ein. Die Konidiophoren und Konidien sind hier schon sehr weit entwickelt.

Abb. 5a, 5b: Durchbruchstelle von Konidiophoren von Microcyclus ulei, 6 Tage nach Inokulation, Kompatible Wirt-Pathogen Kombination (5a: UV-Anregung, 5b: Blauanregung)

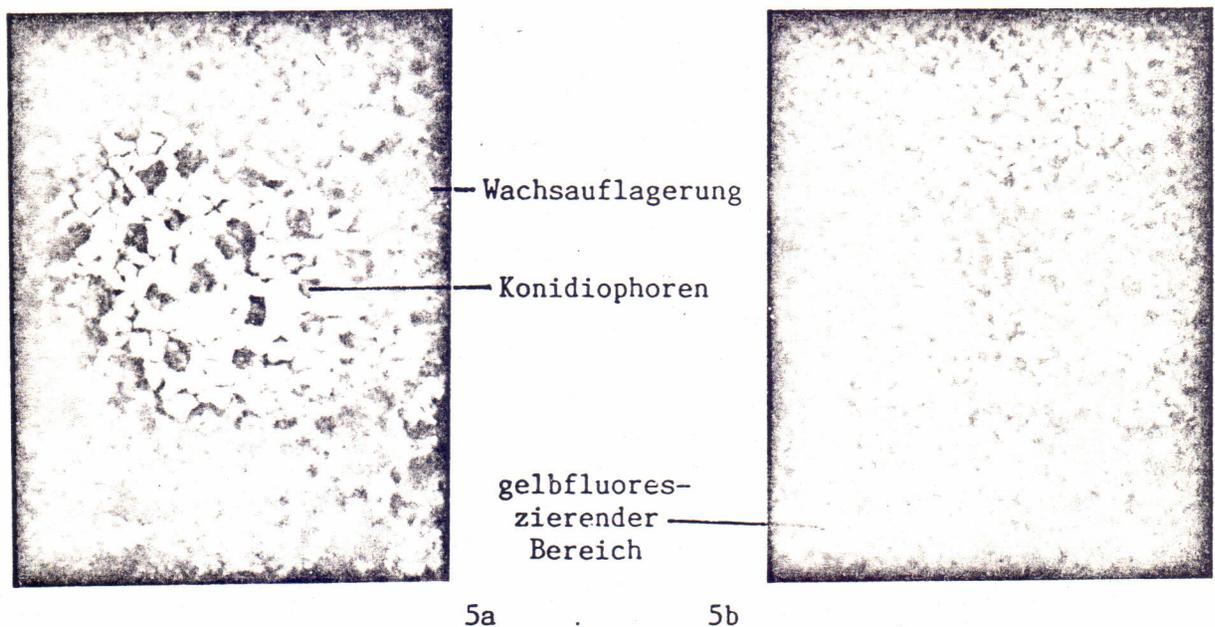
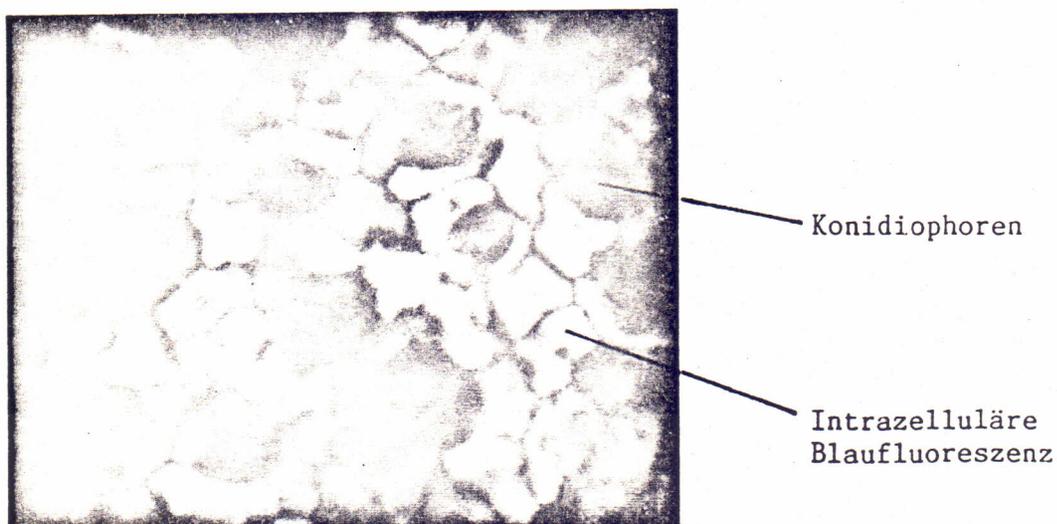


Abb. 5c: wie Abb. 5a, Ausschnittvergrößerung:



5. Vorläufige Hypothese zur Deutung der mikroskopischen Aspekte unter Einbeziehung der Daten von Giesemann (Publ. 7) und Meyer (Publ. 10): Im Zuge der Resistenzreaktion von Hevea reagieren lebende Zellen mit der Bildung von Scopoletin (Publ. 5, 7), welches interzellulär und in den Infektionstropfen auftritt. Scopoletin wird in lebenden Geweben in das Glucosid Scopolin umgewandelt (Publ. 10). Das Glucosid ist intrazellulär lokalisiert und beeinflußt die Pathogenentwicklung nicht, wenn diese Zellen nicht zerstört werden. Nach Meyer (Publ. 10) findet die Umwandlung von Scopoletin zu Scopolin sowie von Scopolin in noch unbekannte Folgeprodukte in lebenden Geweben statt. Bei der Nekrotisierung im Zuge der Hypersensitiven Reaktion wird das Scopoletin wahrscheinlich durch Oxidation über Peroxidasen (Perschke und Broda, 1961: Nature 190, 257-258) umgewandelt. Bei anfälligen Pflanzen, in denen die mit Pilzhypphen in Kontakt kommenden Zellen länger überleben als in hypersensitiv reagierenden Geweben, wird das Scopoletin in die Zellen aufgenommen und -zumindest vorübergehend- im Lumen (Vakuole?) gespeichert. Die Speicherung von glucosidierten Cumarinderivaten in Vakuolen wurde von Werner und Matile (1985, J. Plant Physiol 118, 237-249) gezeigt. Über die Abfolge des Auftretens von Scopoletin und Scopolin in Geweben der Euphorbiacee Maniok berichten Tanaka et al. (1983, Agricultural Biological Chemistry 47(4), 693-700). Es ist zu betonen, daß in diesem Absatz kein Befund, sondern eine Arbeitshypothese dargestellt worden ist. Die biochemischen Studien zur Klärung von Induktion, Synthese und Metabolismus der fungitoxischen Komponenten in Hevea sind im Folgeantrag formuliert.

### 3 Schlußbetrachtung

Die bisherigen Studien haben wesentliche Ebenen der pflanzlichen Resistenz von Hevea gegen den Schadpilz *Microcyclus ulei* aufgedeckt. Die Arbeiten zu den Phytoalexinen sind fortgeschritten, die Untersuchungen zur Wirkung der Cyanogenese auf die Anfälligkeit nahezu in Anwendungsreife. Die Ansätze zum Verständnis der Resistenzebenen sind wesentlich mitbedingt durch die nunmehr zur Verfügung stehenden definierten Isolate des Schadpilzes, mit denen erstmals Studien zur Rassenspezifität und zur Vererbung von Resistenzfaktoren ermöglicht werden. Besondere Bedeutung kommt zur Zeit der in enger Zusammenarbeit mit Brasilien stattfindenden biochemischen und physiologischen Beurteilung neu selektionierter und gezüchteter Heveaklone zu. Die sehr enge Zusammenarbeit mit Herrn Dr. N.T.V. Junqueira aus dem Nationalen Kautschukforschungszentrum Brasiliens in den Jahren 1986 und 1987 ist sehr hervorzuheben. In seinem dreimonatigen Arbeitsaufenthalt von März bis Mai 1987 hat Herr Dr. Junqueira wesentliche Diskussionsansätze für die weiteren Studien eingebracht und auf die neue landwirtschaftspolitische Entwicklung und deren Konsequenz für die weitere Zusammenarbeit hingewiesen. Des weiteren bestehen Kontakte zum International Rubber Research and Development Board (IRRDB, England) sowie eine Kooperation mit dem Rubber Research Institute of Malaysia (RRIM, Malaysia).

Publikationsliste

1. Lieberei, R., Selmar, D., Biehl, B. 1985:  
Metabolization of Cyanogenic Glucosides in *Hevea brasiliensis*.  
Pl. Syst. Evol. 150, 49 - 63.
2. Chee, H.H., Darmono, T.W., Kai-Ming, Z., Lieberei, R. 1985:  
Leaf Development and Spore Production and Germination after  
Infection of *Hevea* Leaves by *Microcyclus ulei*.  
J. Rubb. Res. Inst. Malaysia 33(3), 124 - 137.
3. Lieberei, R. 1985:  
Cyanogenesis of *Hevea brasiliensis* during Infection with  
*Microcyclus ulei*.  
J. Phytopathology 115, 134 - 146.
4. Lieberei, R., Nahrstedt, A., Selmar, D., Gasparotto, L. 1986:  
Occurrence of Lotaustralin in the Genus *Hevea* and Changes of  
HCN-potential in Developing Organs of *Hevea brasiliensis*.  
Phytochemistry 25(7), 1573 - 1578.
5. Giesemann, A., Biehl, B., Lieberei, R. 1986:  
Identification of Scopoletin as a Phytoalexin of the Rubber-  
tree *Hevea brasiliensis*.  
J. Phytopathology 117, 373 - 376.
6. Mevenkamp, G. 1986:  
Charakterisierung und Lokalisierung der  $\beta$ -Cyanoalanin-  
synthase ( $\beta$ -CAS) in Blättern von *Hevea brasiliensis*  
Diplomarbeit, Botan. Inst. TU Braunschweig
7. Giesemann, A. 1986:  
Resistenzbedingende Faktoren in der Wirt-Pathogen Beziehung  
*Hevea* sp./*Microcyclus ulei*.  
Dissertation, Botan. Inst. TU Braunschweig
8. Selmar, D. 1986:  
Cyanogenese in *Hevea*: Zwei Wege zur Metabolisierung  
cyanogener Glycoside.  
Dissertation, Botan. Inst. TU Braunschweig
9. Selmar, D., Lieberei, R., Biehl, B., Voigt, J. 1987:  
*Hevea* linamarase - A Nonspecific  $\beta$ -glycosidase.  
Plant Physiology 83, 557 - 563.
10. Meyer, R. 1987:  
Phytoalexine in Blättern von *Hevea* species.  
Diplomarbeit, Botan. Inst. TU Braunschweig.
11. Lieberei, R. 1987:  
Relationship of cyanogenic capacity (HCN-c) of the rubber  
tree *Hevea brasiliensis* to susceptibility to *Microcyclus*  
*ulei*, the agent causing South American leaf blight.  
eingereicht bei J. Phytopathology.

12. Selmar, D., Lieberei, R., Biehl, B., Nahrstedt, A., Schmidtman, V., Wray, V. 1987:  
Occurrence of the cyanogen Linustatin in *Hevea brasiliensis*.  
Phytochemistry. Druckfahnen beigelegt.
13. Selmar, D., Lieberei, R., Biehl, B.:  
Metabolization of cyanogenic glycosides II: The linustatin  
pathway.  
Manuskript
14. Selmar, D., Lieberei, R., Biehl, B., Conn, E.E.:  
Hydroxynitrile Lyase in *Hevea brasiliensis* and its  
significance for a rapid cyanogenesis.  
Manuskript
15. Lieberei, R. 1986:  
Infection-induced cyanogenesis inhibits active defense  
reactions.  
Poster, Int. Symp. on Plant Molec. Biol. Strasbourg, Fl.
16. Selmar, D., Lieberei, R., Biehl, B. 1986:  
Transport of cyanogenic glycosides in *Hevea brasiliensis*.  
Poster, 5th Congress of the Federation of European Societies  
of Plant Physiology Hamburg, 9-27.
17. Lieberei, R., Giesemann, A., Mevenkamp, G., Meyer, R. 1986:  
Wechselwirkung infektionsbedingter Cyanogenese mit der  
Phytoalexinbildung beim Kautschukbaum *Hevea brasiliensis*.  
Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land-  
und Forstwirtschaft Berlin-Dahlem, 232, 227.

Arbeiten der Kooperationspartner:

18. Junqueira, N.T.V. 1985:  
Variabilidade Fisiologica de *Microcyclus ulei* (P. Henn.)  
Dissertation, Universidade Federal de Vicosa, Minas Gerais,  
Brasil.
19. Junqueira, N.T.V., Zambolim, L., Chaves, G.M., Gasparotto, L. 1986:  
Esporulacao in vitro, viabilidade dos conidios e  
patogenicidade de *Microcyclus ulei*.  
Fitopatologia Brasileira, 11(3), 667 - 682.
20. Junqueira, N.T.V., Chaves, G.M., Zambolim, L., Gasparotto, L. 1987:  
Variabilidade fisiologica de *Microcyclus ulei*  
Fitopatologia Brasileira, in press
21. Junqueira, N.T.V., Alfenas, A.C., Chaves, G.M., Zambolim, L. 1987:  
Variabilidade isoenzimatica de isolados de *Microcyclus ulei*  
com diferentes niveis de virulencia  
Fitopatologia Brasileira, in press

22. Junqueira, N.T.V., Chaves, G.M., Zambolim, L., Gasparotto, L. 1987:  
Reacao de clones de seringueira a varios isolados de  
Microcyclus ulei.  
Pesq. Agrotec. Bras., in press
23. Darmono, T.W., Chee, K.H. 1985:  
Reaction of Hevea clones to Races of Microcyclus ulei in  
Brazil.  
J. Rubb. Res. Inst. Malaysia 33(1), 1 - 8.

Revisão do manuscrito 20 Junho 1987

D. Ribeiro 20. Jun 1987