



Doctoral Thesis

**Infection of beech leaves by the endophyte *Discula umbrinella* (Berk. & Br.) Morelet teleomorph: *Apiognomonina errabunda* (Rob.) Höhnelt
an ultrastructural study**

Author(s):

Viret, Olivier

Publication Date:

1993

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-000909537> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss. ETH Nr. 10073

**Infection of beech leaves by the endophyte *Discula umbrinella*
(Berk. & Br.) Morelet [teleomorph: *Apiognomonina*
errabunda (Rob.) Höhnel]: an ultrastructural study**

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZÜRICH

for the degree of
Doctor of Natural Sciences

presented by
Olivier Viret
dipl. Ing. Agr. ETHZ
born November 18, 1963
citizen of Gollion-Villars-Tiercelin (VD)

accepted on the recommendation of
PD Dr. O. Petrini, examiner
Prof. Dr. H. Hennecke, co-examiner
PD Dr. R. Honegger, co-examiner

Zürich 1993

Summary

The aim of this study was to detect the mode of penetration and colonisation of beech leaves by the symptomless endophyte *Discula umbrinella*, a fungus known to induce only sporadically anthracnose of beech leaves.

In a first step, appropriate methods were developed to carry out the investigation. Light microscopy was useful only for preliminary observations of the endophyte on the leaf surface and at the subcuticular level. To a large extent, however, only electron microscopy could provide all the necessary information. Only high pressure freezing was useful to study the ultrastructure of the conidia of *D. umbrinella*, since the extracellular matrix present around the conidial cell wall was completely dissolved after conventional chemical fixation. On the other hand, cryofixation of the beech leaf resulted in an only partial preservation of the tissues, thus making this method inadequate to detect the endophyte in the tissues and to study its interaction with the host. Therefore, subsequent studies of the infection process on the beech leaf were carried out using chemical fixation. Low temperature scanning electron microscopy was shown to be the most adequate method to study the endophyte on the leaf surface.

To facilitate the detection of the fungus in the tissues, disease symptoms were induced by exposing the leaves to stress conditions. On detached beech leaves, and to a lesser extent on whole infected plants, the fungus induced conspicuous necrotic spots. A reaction of the host was apparently involved, since the symptoms were limited to the infection drops.

Ultrastructural studies of the conidia of *D. umbrinella* revealed the presence of a fibrillar extracellular matrix composed of (glyco)-proteins and polysaccharides. The inner part of the conidial cell wall is electron transparent and contains mainly chitin. *D. umbrinella* from different hosts are morphologically distinguishable by the shape and size of their extracellular matrices, which may be indicative of an adaptation to different leaf surface morphologies.

In vitro cytological investigations demonstrated clearly that *D. umbrinella* is able to penetrate the host, directly or after the formation of an appressorium, and to colonise after a period of latency the whole tissue, inducing necrotic spots. Colonisation of the beech leaf is apparently mediated by enzymes which may be activated by host signals, but the action of mechanical forces cannot be excluded. The infection process started with a specific adhesion of the fungal conidia to the host surface. Polysaccharides such as mannans and glucans or their moieties and (glyco)-proteins present in the extracellular matrix of the conidia are clearly involved in the binding process, since the ablation of the fibrils inhibited the adhesion to the host surface. It is possible that

compounds present on the leaf surface are specifically recognised by the extracellular fungal matrix. When contact with the host is established, leaf compounds that act as signals for the fungus possibly induce spore germination.

This study demonstrates that endophytes which are present in host tissues without causing disease symptoms may be latent pathogens, their pathogenic character being expressed under particular conditions only.

Résumé

Le but de ce travail est de détecter le mode de pénétration et de colonisation de feuilles de hêtre par l'endophyte *Discula umbrinella*, un champignon induisant sporadiquement l'anthracnose du hêtre.

Dans un premier temps, les méthodes appropriées à cette étude ont été développées. La microscopie photonique n'apporte des informations utiles que pour des observations préliminaires de la surface des feuilles et au niveau subcuticulaire. Seule la microscopie électronique, au sens large du terme, permet d'obtenir des informations détaillées. La cryofixation sous haute pression s'avère être la méthode la mieux adaptée au maintien de l'ultrastructure des conidies de *D. umbrinella* puisque la matrice extracellulaire présente autour des conidies est complètement dissoute par la fixation chimique conventionnelle. D'autre part, la cryofixation de matériel végétal reste un problème. En effet, le tissu n'est que partiellement préservé, rendant la méthode inadéquate à la détection de l'endophyte et à l'étude de l'interaction avec son hôte. Ainsi, toutes les études impliquant la feuille de hêtre ont été conduites en fixant le matériel conventionnellement. Pour l'observation de l'endophyte à la surface de la feuille, la microscopie à balayage à basse température est la méthode la mieux adaptée.

Pour faciliter la détection du champignon dans le tissu, des symptômes ont été induits en soumettant les feuilles à des conditions de stress. L'infection de feuilles détachées de la plante ainsi que de plantes entières provoque des nécroses macroscopiquement visibles. Toutefois, l'hôte semble réagir, puisque les symptômes ne s'étendent pratiquement pas au-delà des gouttes d'infection.

L'étude ultrastructurale des conidies de *D. umbrinella* démontre la présence d'une matrice fibrillaire extracellulaire composée de (glyco)-protéines et de polysaccharides. La partie interne de la paroi cellulaire des conidies est transparente aux électrons et contient principalement de la chitine. Différents isolats de *D. umbrinella* provenant de différents hôtes se distinguent morphologiquement par la forme et les dimensions de leur matrice extracellulaire, pouvant indiquer une adaptation à différentes surfaces de feuilles.

Les travaux cytologiques *in vitro* démontrent clairement que *D. umbrinella* peut pénétrer son hôte directement ou en formant un appressorium et, après une période de latence, coloniser tout le tissu, induisant des nécroses. La colonisation de la feuille de hêtre semble être dirigée par des enzymes pouvant être activés par des signaux de l'hôte, toutefois l'intervention de forces mécaniques ne peut pas être exclue. L'infection commence par l'adhésion spécifique des conidies à la surface de la feuille. Des polysaccharides, tels que des mannanes et des glucanes ou leurs dérivés ainsi que des (glyco)-protéines présents dans la matrice extracellulaire des conidies sont clairement

responsables de l'adhésion, puisque l'ablation des fibrilles inhibe complètement ce mécanisme. Il est possible que des composés présents à la surface de la feuille soient spécifiquement reconnus par des substances extracellulaires du champignon. Lorsque le contact avec l'hôte est établi, des composés de la feuille, jouant probablement le rôle de signaux pour le champignon, induisent la germination.

Cette étude démontre que les endophytes vivant dans les tissus de leur hôte sans provoquer de symptômes peuvent être des pathogènes latents exprimant leur pathogénicité que dans des conditions particulières.

Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit ist es, das Eindringen und die Kolonisationsmechanismen des Endophyten *Discula umbrinella* auf Buchenblätter zu untersuchen.

In einem ersten Teil mussten die Methoden auf diese Untersuchung angepasst werden. Das Lichtmikroskop ergab zufriedenstellende Resultate nur für Beobachtungen der Wirtsoberfläche und im subkutikularen Bereich des Gewebes. Detailinformationen konnten nur mit Hilfe der Elektronenmikroskopie erzielt werden. Ultrastrukturelle Studien der Konidien von *D. umbrinella* konnten nur nach Kryofixation unter hohem Druck befriedigend durchgeführt werden, da extrazelluläre Komponenten nach konventioneller chemischer Fixation aufgelöst werden. Das Hochdruckgefrieren von pflanzlichem Material bleibt allerdings ein Problem. Nur einzelne Stellen der Proben bleiben gut erhalten, was den genauen Nachweis des Endophyten im Blattgewebe hindert und somit die Untersuchung der Interaktion mit dem Wirt nicht erlaubt.

Um das Finden des Pilzes im Wirtsgewebe zu ermöglichen, wurden Symptome induziert, indem die Blätter unter Stressbedingungen gestellt wurden. Sowohl auf von der Pflanze abgetrennten Blättern, als auch auf ganzen Pflanzen kann der Pilz den Wirt besiedeln und sichtbare Nekrosen induzieren. Dabei findet eine Reaktion durch die Pflanze statt, weil sich die Symptome auf der Fläche der Infektionstropfen beschränken.

Ultrastrukturelle Studien der Konidien von *D. umbrinella* zeigen das Vorhandensein einer extrazellulären fibrillären Matrix, welche aus (Glyko)-proteinen und Polysacchariden besteht. Der innere Teil der Konidienzellwand ist elektronendurchsichtig und enthält Chitin. Verschiedene Isolate von *D. umbrinella* aus verschiedenen Wirten unterscheiden sich in der Morphologie der extrazellulären Matrix, was eine Anpassung an unterschiedliche Oberflächenbeschaffenheiten andeutet.

In vitro zeigen zytologische Untersuchungen, dass *D. umbrinella* in seinen Wirt ohne Bildung eines Appressoriums einzudringen vermag. Ein Appressorium kann aber auch gebildet werden, und nach einer Latenzzeit des Pilzes kann das ganze Gewebe unter Bildung von Nekrosen kolonisiert werden. Die Kolonisation des Buchenblattes findet wahrscheinlich durch enzymatische Einwirkungen statt, obwohl die Mitwirkung mechanischer Kräfte nicht ausgeschlossen werden kann. Der Infektionsprozess beginnt mit dem spezifischen Haften der Konidien auf der Wirtsoberfläche. Polysaccharide wie Mannane und Glukane oder ihre Derivate und (Glyko)-proteine, die in der extrazellulären Konidienmatrix vorhanden sind, sind ebenfalls im Haftungsprozess beteiligt, da eine Auflösung dieser Schicht das Haften völlig unterbindet. Es ist möglich, dass Substanzen, die auf der Wirtsoberfläche vorhanden sind, spezifisch von extrazellulären Komponenten

des Pilzes erkannt werden. Wenn der Kontakt mit dem Wirt vorhanden ist, induzieren wahrscheinlich Blattkomponenten die Keimung der Sporen.

Diese Arbeit zeigt auch, dass ein symptomloser Endophyt unter gewissen Bedingungen als latenter Pathogen lebt.