

DISS. ETH NO. 19714

**NATURAL DISEASE CONTROL BY ROOT ENDOPHYTES IN A
CHANGING CLIMATE**

A dissertation submitted to
ETH ZURICH
for the degree of
Doctor of Sciences

presented by
CHRISTOPH ULRICH TELLENBACH
MSc ETH

born 26 August 1981
citizen of Oberthal, BE

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. Ottmar Holdenrieder, examiner
Dr. Steve Woodward, co-examiner
Dr. Thomas Niklaus Sieber, co-examiner

2011

SUMMARY

Fungal endophytes are common symbionts in functional and apparently healthy roots and do not form any complex structures such as mycorrhizal fungi do. Root endophytes are genetically highly diverse suggesting important ecological roles. Yet, relative to above-ground endophytes, little is known about them. Ascomycete fungi of the *Phialocephala fortinii* s.l.-*Acephala applanata* cryptic species complex (PAC) that belong to the dark septate endophytes (DSE) are ubiquitous endophytic colonizers of conifer and ericaceous shrub roots, but their ecological function is largely unknown. Whilst some experimental data suggest that they are mutualists, others propose that they are antagonists. These discrepancies might be due to the fact that species assignment was not known when these studies were performed or that the effect of PAC on host plants depends on the extent of fungal colonization. On the other hand, PAC might indeed be associated with direct costs for some hosts, but might have indirect beneficial effects by conferring resistance to plants against biotic and/or abiotic stress.

Therefore, a series of *in vitro* experiments was performed to investigate the nature of interaction of PAC with Norway spruce, one of their main hosts in Europe. In addition, a quantitative real-time PCR (qPCR) approach was developed to quantify fungal DNA as a surrogate of fungal biomass in colonized roots and compared with visual assessment of fungal colonization in samples. qPCR reliably and specifically detected PAC in different types of samples and correspondence with visual assessment was very high if the fungus did not produce too many microsclerotia.

In a dual interaction experiment, Norway spruce seedlings from two different seed provenances were inoculated with isolates of the four most common PAC species to investigate possible interspecific differences in host response to PAC. Moreover, *P. subalpina* isolates of two populations from within and one from outside the natural range of Norway spruce were inoculated to study the effect of geographic origin on host response. PAC did not promote seedling growth in any case and their effects on Norway spruce were primarily isolate-dependent. Variation in virulence was much higher within than among species, but the most virulent isolates belonged all to *P. subalpina*. Disease caused by *P. subalpina* genotypes from within the native range of Norway spruce was more severe than that induced by genotypes from outside the natural distribution of Norway spruce. Moreover, virulence was not correlated with the phylogenetic relatedness of the isolates but was positively correlated with the extent of fungal colonization as measured by qPCR. Thus, these experiments suggest that PAC are neutral to pathogenic symbionts of Norway spruce in this system.

In a tripartite host-endophyte-pathogen system it was tested whether six genetically distinct isolates of *P. subalpina* varying in virulence can protect their host against the two oomycetous root pathogens *Phytophthora plurivora* (syn. *P. citricola*) and *Elongisporangium undulatum* (syn. *Pythium undulatum*). Whilst oomycete diseases are predicted to increase under climate change, the symbiotic relationship between PAC and Norway spruce might be altered in favor or to the disadvantage of either host and/or endophyte. Therefore, an elevated temperature treatment was included, to investigate whether a possible protective effect of PAC against the two pathogens might be affected. Protection of the spruce seedlings depended on the *P. subalpina* isolate, but was not affected by elevated temperature. Moreover, whilst the higher temperature significantly reduced spruce performance, it did not alter root colonization by *P. subalpina* and its influence on the host. Similarly, disease intensity of *Phytophthora* was not affected. In contrast, the influence of *Elongisporangium* on plant biomass was slightly less pronounced at elevated temperature. These results indicate that PAC can confer an indirect benefit to their host, and might therefore be tolerated in natural populations, despite negative effects on plant performance.

The results of these *in vitro* experiments corroborate findings of other studies that position PAC between neutral and pathogenic on the mutualism – antagonism continuum. Moreover, it was shown that PAC might confer an indirect benefit to their host by protecting it against harmful root pathogens. However, these findings are only the very beginning of our understanding of the ecological significance of PAC and deserve to be followed by further investigations under more natural conditions.

ZUSAMMENFASSUNG

Endophytische Pilze kommen häufig als Symbionten in funktionstüchtigen und gesunden Wurzeln vor, bilden aber im Unterschied zu den Mykorrhiza-Pilzen keine komplexen Strukturen. Im Vergleich zu Stamm- und Blattendophyten ist immer noch wenig über Wurzelendophyten bekannt, obschon angenommen wird, dass sie ökologisch sehr wichtig sind, da sie weit verbreitet und genetisch sehr vielfältig sind. Ascomyceten vom *Phialocephala fortinii* s.l.-*Acephala applanata* kryptischen Artenkomplex (PAC) gehören zu den dunklen septierten Endophyten (DSE) und sind häufige Wurzelbesiedler von Koniferen und Erikagewächsen. Die ökologische Bedeutung von PAC ist weitgehend unbekannt und Berichte verschiedener Studien sind unterschiedlich. Währendem in einigen Studien ein positiver Einfluss von PAC auf ihren Wirt festgestellt wurde, werden in anderen PAC eher als Antagonisten beschrieben. Die Diskrepanz zwischen diesen Studien könnte daran liegen, dass die Unterteilung von PAC in kryptische Arten noch nicht bekannt war, als diese Studien durchgeführt wurden. Es könnte aber auch daran liegen, dass der Einfluss von PAC auf die Pflanze von der Besiedlungsdichte des Pilzes abhängig ist oder dass PAC tatsächlich mit Kosten für die Wirtspflanze verbunden sind, ihr aber einen indirekten Vorteil verschaffen, indem sie sie vor biotischem, und/oder abiotischem Stress schützt.

Mögliche ökologische Funktionen von PAC wurden in verschiedenen *in vitro* Experimenten mit Gemeiner Fichte, einem ihrer Hauptwirten, durchgeführt. Ausserdem wurde eine quantitative Real-Time PCR (qPCR) entwickelt, um die endophytische Pilzbiomasse, basierend auf der Pilz-DNA, zu schätzen. Die Qualität der Schätzwerte wurde mit derjenigen einer visuellen mikroskopischen Messmethode verglichen. Mittels qPCR konnten PAC in unterschiedlichen Probenotypen zuverlässig und spezifisch gefunden und gemessen werden. Ausserdem stimmten qPCR und visuelle Beurteilung sehr gut überein, vorausgesetzt, der Pilz bildete nicht allzu viele Mikrosklerotien.

In einer Interaktionsstudie wurden Fichtenkeimlinge von zwei verschiedenen Provenienzen mit Isolaten der vier häufigsten PAC Arten inokuliert um zu untersuchen, ob die Pflanzen unterschiedlich auf die verschiedenen Pilzarten reagieren. Zusätzlich wurden Keimlinge mit *P. subalpina* Isolaten von zwei Populationen innerhalb und einer ausserhalb des natürlichen Verbreitungsgebiets der Gemeinen Fichte inokuliert um den Effekt der geographischen Herkunft von PAC zu untersuchen. Ein wachstumsfördernder Effekt von PAC auf die Fichtenkeimlinge wurde in keinem Fall gefunden und der Effekt variierte von neutral bis hoch virulent und war in erster Linie isolatabhängig. Die Virulenz variierte innerhalb der Arten viel stärker als zwischen den Arten. Die virulentesten Isolate gehörten aber ausschliesslich zu *P. subalpina*. *P. subalpina* Isolate von innerhalb des natürlichen

Verbreitungsgebiets der Fichte waren schädlicher als Isolate von ausserhalb. Die Virulenz von PAC war nicht korreliert mit der phylogenetischen Verwandtschaft der Isolate, wogegen die Virulenz mit der Besiedlungsdichte des Pilzes positiv korreliert war. Die Resultate dieser Studie deuten an, dass PAC im hier verwendeten System neutrale bis pathogene Symbionten von Fichte sind.

In einem tripartiten Wirt-Endophyt-Pathogen System wurde getestet, ob sechs *P. subalpina* Isolate mit unterschiedlicher Virulenz die Fichte gegen die beiden Wurzelpathogene *Phytophthora plurivora* (syn. *P. citricola*) und *Elongisporangium undulatum* (syn. *Pythium undulatum*), beides Oomyzeten, schützen können. Es wird angenommen, dass durch Oomyzeten verursachte Krankheiten unter dem Klimawandel an Bedeutung gewinnen werden. Im Gegensatz dazu ist über den Einfluss steigender Temperaturen auf Endophyten nur wenig bekannt, und es ist möglich, dass die symbiontische Beziehung zum Vor- oder Nachteil von Wirt und/oder Endophyt verändert wird. Um diese Effekte zu studieren wurde eine zusätzlich Behandlung mit erhöhter Temperatur im Experiment implementiert, um deren Einfluss auf eine mögliche Schutzwirkung von PAC gegen die beiden Pathogene zu ergründen. Die Schutzwirkung hing vom *P. subalpina* Isolat ab und wurde nicht von erhöhter Temperatur beeinflusst. Währendem erhöhte Temperatur das Wachstum der Fichtenkeimlinge hemmte, wurde die Wurzelbesiedlung von PAC weder positiv noch negativ verändert. Ähnlich wurde auch die Krankheitsintensität von *Phytophthora* nicht von erhöhter Temperatur beeinflusst, wogegen der Einfluss von *Elongisporangium* auf die Pflanzenbiomasse bei erhöhter Temperatur etwas weniger stark ausgeprägt war. Die Resultate dieses Versuchs deuten an, dass PAC mit ihrer Schutzwirkung der Wirtspflanze einen indirekten Vorteil verschaffen können, was erklären würde, wieso sie trotz zum Teil schädigender Wirkung in natürlichen Populationen von ihrem Wirt toleriert werden.

Die Resultate dieser *in vitro* Studie bestätigen ältere Befunde von Untersuchungen, die PAC im neutralen bis pathogenen Bereich vom Mutualismus – Antagonismus Kontinuum ansiedeln. Es wurde jedoch gezeigt, dass PAC ihrem Wirten einen indirekten Vorteil verschaffen können, indem sie Schutz gegen Wurzelpathogene bieten. Diese Befunde sind aber erst der Anfang unseres Verständnisses der ökologischen Relevanz von PAC und müssen auch unter natürlicheren Bedingungen überprüft werden.