

Phytoprotection



Close-up on some aspects of fungal wilt diseases (available at www.wilt-ism.net and on DVD)

Focus sur certains aspects des flétrissements causés par les champignons (disponible sur www.wilt-ism.net et en DVD)

Guillemond B. Ouellette, Pierre-Mathieu Charest et Hélène Chamberland

Volume 88, numéro 3, 2007

La phytoprotection, 100 ans de découvertes!
Phytoprotection: 100 years of discovery

URI : <https://id.erudit.org/iderudit/018952ar>

DOI : <https://doi.org/10.7202/018952ar>

[Aller au sommaire du numéro](#)

Éditeur(s)

Société de protection des plantes du Québec (SPPQ)

ISSN

0031-9511 (imprimé)

1710-1603 (numérique)

[Découvrir la revue](#)

Citer cet article

Ouellette, G. B., Charest, P.-M. & Chamberland, H. (2007). Close-up on some aspects of fungal wilt diseases (available at www.wilt-ism.net and on DVD). *Phytoprotection*, 88(3), 77–81. <https://doi.org/10.7202/018952ar>

Tous droits réservés © La société de protection des plantes du Québec, 2007

Ce document est protégé par la loi sur le droit d'auteur. L'utilisation des services d'Érudit (y compris la reproduction) est assujettie à sa politique d'utilisation que vous pouvez consulter en ligne.

<https://apropos.erudit.org/fr/usagers/politique-dutilisation/>

érudit

Cet article est diffusé et préservé par Érudit.

Érudit est un consortium interuniversitaire sans but lucratif composé de l'Université de Montréal, l'Université Laval et l'Université du Québec à Montréal. Il a pour mission la promotion et la valorisation de la recherche.

<https://www.erudit.org/fr/>

Close-up on some aspects of fungal wilt diseases

(available at www.wilt-ism.net and on DVD)

Guillemont B. Ouellette¹,
in collaboration with Pierre-Mathieu Charest² and Hélène Chamberland³

Received 2008-04-08; accepted 2008 05-06

PHYTOPROTECTION 88 : 77-81

This Web site presents a collection of articles related to fungal wilt diseases and their pathogen, with emphasis on Dutch elm disease (DED). Numerous electron microscopy (EM) micrographs are shown in the longest papers, and they generally are presented in large enough dimensions and magnifications so that readers can easily see the features at stake and follow their descriptions. The following presentation summarizes the rationale which, with time, led to the creation of this Web site.

In 1954, when the senior author undertook studies on DED, which is caused by the pathogen now known as *Ophiostoma novo-ulmi* Brasier, a first objective was to detect pathogen occurrence in the tree and to discover its exact mode of action. Indeed, up to that point, reports of histopathological studies were based on light microscope investigations and they all mentioned that pathogen cells were rarely observed in invaded tissue. One of the explanations given to account for this phenomenon was that most fungal cells present in vessel lumina could be lost during sample manipulations. The advent of new techniques of tissue fixation and embedding made it possible to observe a greater number of pathogen elements that were not related to the inoculum. Yet, the first determinant of pathogenesis was not believed to be directly related to the sole physical detrimental effect of pathogen elements, so much so that their presence in paratracheal cells was only casually observed. Thus, investigations were carried out by other researchers to isolate possible toxins or hydrolyzing enzymes produced by the pathogen in order to determine if any of them could be related to the disease symptomatology, but still assuming that the dysfunction of vessel elements would be the main factor involved. In this scheme, the effect on paratracheal and adjoining cells would be one of secretion into vessel lumina of substances apt to favour or inhibit fungal growth, such as phytoalexins, or of compounds influencing host physiological functions or leading to anatomical changes such as tylose formation. Some of these substances were isolated and identified, but the presence of others was postulated rather than clearly ascertained. One issue in this respect was to determine beyond all doubt the origin and nature of the

material deposited as lining on vessel walls. Yet, these factors were not always consistent between different hosts affected with similar diseases.

In the course of our own transmission electron microscope and cytochemical studies of elms and non-hosts inoculated with the DED pathogen (conducted in collaboration with a number of people whose names appear as senior or as co-authors of some of the publications listed on the Web site) and of other plant wilt diseases, observations pointed to other possibilities that could explain the syndrome of these diseases, including host tissue alterations and reactions. Briefly, these studies showed that a large part of the substances that accumulate in vessel elements, including those forming linings, could be attributable to pathogen origin and be directly involved in tissue invasion and cell attacks. Pronounced breakdown of membranes of half-bordered pits and middle lamellae was also shown to be associated with the presence of unbound opaque matter, which was occasionally shown to pervade host secondary cell walls (particularly in young tissue) and reach into cell content. This matter was shown to label for DNA in elm and *Fusarium*-infected staghorn sumac (*Rhus typhina* L.). Visible cell reactions to such invasions included the deposition of new wall material in host cells, including fibres and vessel elements in some hosts, or the formation of compartmentalization tissues in elm trees (American elm, *Ulmus americana* L., and other species), in *Fusarium*-infected carnation (*Dianthus caryophyllus* L., in particular), and in non-hosts inoculated with the DED pathogen (see Rioux and Ouellette 1991, Can. J. Bot. 69: 2074-2083; and Baayen *et al.* 1996, Phytopathology 86: 1018-1031).

Upon re-examining closely the numerous micrographs on which the present work is based, fine structures were detected that appeared to be closely related to host cell alterations and/or reactions in the affected hosts; the greater the abundance of these structures, the more pronounced the alterations, and vice versa for the reactions. There was also some similitude between these structures and some nucleic and mitochondrial components in host cells and pathogen elements; however, these structures were

1. 3413, rue de Sarnia, Québec (Québec) Canada G1X 2K5; corresponding author e-mail: gouellette_3@sympatico.ca
2. Faculté des sciences de l'agriculture et de l'alimentation, Université Laval, Québec (Québec) Canada G1V 0A6
3. 519, rue Givot, Québec (Québec) Canada G1B 3A1

absent from intact cell cytoplasm. Similar structures were noticeable in the material lining vessel walls and in that present in vessel lumina, and in material associated with the breakdown of membranes of half-bordered pits, in the material accumulating in middle lamellae (particularly in immature tissue) in the above-mentioned opaque matter, and in that secreted from fungal elements.

Based on these observations, knowing whether such structures could be detected in other works became essential. A survey of over 100 works on related subjects authored by ourselves or by other researchers was conducted to achieve this goal, and the structures in question were detected in most of them; these works concerned various healthy or infected hosts and organisms (some of them grown on pre-sterilized substrates), presented various methods of fixation and embedding, particular treatments, and so on. At least this showed that the presence of these structures could not be attributable to artefacts of fixation. Representative publications on this subject are listed under "P-elements-epilogue" on the Web site.

On the Web site, the importance of these observations is presented in a general discussion, of which some of the points can be highlighted. 1) The initial disease determinant in the diseases studied does not appear to be attributable to invasion by pathogen elements of regular shapes and sizes, but instead by elements not showing typical organization and not always being clearly delimited by enclosing visible membranes and wall. Many of these unusual features have been observed even when growing fungi under particular substrates or conditions, as for example *O. novo-ulmi* developing on Millipore membranes of 0.22 μm or 0.45 μm porosity or in the presence of bromodeoxyuridine (BrdU) (see parts III and V of article XI on the Web site). 2) The matter accumulating on vessel walls is mostly attributable to the presence of the pathogen, as an extension of thin elements or as material excreted from these or from more typical fungal cells. 3) The most detrimental disease effect is evidenced by pronounced alterations in young tissue at the cambial level, which cannot be immediately circumvented, or next to recurrent attacks. 4) Even though pit membranes of half-bordered pits may be appreciably altered, their degradation products do not seem to be released into vessel lumina in great amounts, and thus they likely do not appreciably contribute to vessel occlusion. 5) The opaque material accumulating in the periplasm of affected paratracheal cells does not precede the presence of a similar material in pit membranes. 6) The present interpretations were supported by autoradiographic means and by labelling with gold-complex probes to localize specific substrates (such as with lectins, enzymes, monoclonal and polyclonal antibodies).

A positive reaction for pectic substances in vessel lumina generally occurred in conjunction with well-defined fibrils, shown to be secreted from paratracheal cells and tyloses (e.g., Rioux *et al.* 1998, *Phytopathology* 88: 494-505), and occasionally with noticeable amounts in the cells themselves. An important observation also made was that in some cases, pectic material appeared to have a direct detrimental effect on fungal growth itself (see

Ouellette *et al.* 2004, *Microsc. Microanal.* 10: 449-461, and article II on the Web site).

In light of these results, it seems that a reassessment of reports on the occurrence and role of tyloses should definitely be made, considering that the ground notions mainly came from light and scanning microscope observations in which tyloses can easily be mistaken for alveolar networks. In the senior author's Ph.D. thesis (1960), attention had been paid to this point. We have postulated that this network, which was often confluent with and texturally similar to the vessel wall lining material, was primarily of pathogen origin. It is possibly the reason why this difference was ignored by others for so long. A paper published by Foisner *et al.* (1985, *Trans. Br. Mycol. Soc.* 85: 257-266), which was unfortunately overlooked during preparation of the Web site, lends support to our view. Indeed, the authors of this paper entitled "Wood decay by basidiomycetes: extracellular tripartite membranous structures", which deals with fungi grown on pre-sterilized wood blocks, illustrate many structures that recall, in arrangement and configuration, the alveolar network and, in some situations, also appear to be associated with wall linings (see their Figs. 1-3, in particular). Also, structures similar to "P-elements" can be distinguished in this lining (Fig. 1), which also appears to extend at sites into the wood wall. Thus, the authors were justified in mentioning that the structures in question were of fungal origin. Interestingly, they also referred to the occurrence of small opaque bodies in the colonized wood. Could these, by any chance, be compared with the opaque particles that have been observed in our work? Similarly, the feature illustrated in a publication by Wergin (1972, *Phytopathology* 62: 1045-1051, Fig. 3) is also worthy of consideration.

Finally, a question is raised as to whether the type of fungal development described here could be akin to the description of "mycoplasmas" proposed as a type of fungal development at the beginning of the last century, or to the recently proposed term "mycosomes". The latter, by considering things as they are presently, might be broadened to include any type of protoplasmic-like fungal development, which in fact departs from that known from fungal growth on artificial media. Attention should be paid to part V of article XI (on the Web site), which focuses on the constant recovery of the DED pathogen from its liquid culture filtrates obtained by filtration through Millipore membranes of the same porosities as those mentioned above. The elements from which the fungus seemingly grew corresponded to small bodies to which tiny filamentous structures were attached, the whole recalling the elements occurring in vessel elements of eggplants affected by *Verticillium* wilt. The morphology of some colonies first formed following smears of the filtrates on agar media was also particular, but it eventually yielded more typical colonies following second transfers.

Focus sur certains aspects des flétrissements causés par les champignons (disponible sur www.wilt-ism.net et en DVD)

Guillemont B. Ouellette¹,
en collaboration avec Pierre-Mathieu Charest² and Hélène Chamberland³

Ce site Web contient des articles portant sur les maladies de flétrissement et sur leur agent pathogène, tout en accordant une attention particulière à la maladie hollandaise de l'orme (DED; *Dutch elm disease*). Les articles les plus longs contiennent plusieurs micrographies présentées en dimensions et agrandissements suffisants pour permettre au lecteur de visualiser adéquatement et facilement les points décrits. Le présent document se veut un exposé succinct du fil conducteur ayant conduit à la réalisation de ce site Web.

En 1954, au moment où l'auteur entreprenait des études doctorales sur la maladie hollandaise de l'orme, un des premiers objectifs était de découvrir où se situaient exactement dans l'arbre les éléments du champignon pathogène (maintenant connu sous le vocable *Ophiostoma novo-ulmi* Brasier) et de déceler son mode d'action réel. En effet, jusqu'alors, tous les rapports concernant l'histopathologie de la maladie provenaient d'études en microscopie photonique et témoignaient de la rareté des éléments fongiques se trouvant dans les éléments de vaisseau. On pouvait supposer que cette absence présumée était attribuable à la perte des cellules fongiques lors de la manipulation des échantillons destinés aux examens microscopiques. Ainsi, la venue de nouvelles techniques de fixation et d'enrobage semble avoir permis une meilleure rétention des éléments fongiques autres que ceux provenant de l'inoculum au cours de ces manipulations. Cependant, en l'absence d'altérations tissulaires notables par contact direct avec des cellules fongiques, d'autant plus que celles-ci se trouvaient rarement dans les cellules voisines des vaisseaux, on a recherché les causes primaires de la pathogenèse de la maladie dans des substances possiblement produites par l'agent pathogène et qui agiraient à distance. Ainsi est apparue la recherche de toxines possibles ou d'enzymes hydrolytiques aptes à jouer ce rôle, en présumant toutefois que leur effet premier se situerait quand même au niveau des vaisseaux. Dans cette optique, l'effet sur les cellules voisines des vaisseaux serait de sécréter des substances favorables ou défavorables au développement de l'agent pathogène, comme les phytoalexines. Certaines substances ont donc été isolées et identifiées comme pouvant affecter la physiologie ou l'histologie de l'hôte, dont notamment l'éthylène qui favorise la formation de thylls. Un aspect controversé dans ce contexte a été de proposer que tout le matériel venant tapisser les parois vasculaires puisse provenir de la plante hôte. Cependant, des

divergences notables ont été constatées par rapport aux différentes plantes hôtes atteintes de maladies similaires.

Ainsi, nos études ultrastructurales concernant l'orme (orme d'Amérique, *Ulmus americana* L., et autres espèces) et des plantes non hôtes inoculées avec *O. novo-ulmi* ainsi que d'autres maladies de flétrissement ou montrant des rapprochements avec celles-ci (conduites en collaboration avec d'autres chercheurs dont les noms apparaissent comme premiers ou seconds auteurs de nos publications mentionnées sur le site Web) ont montré l'existence de nouvelles possibilités pour expliquer le syndrome de ces maladies, y compris les altérations ou les réactions tissulaires. Ainsi, nous avons noté que les substances étrangères aux éléments de vaisseaux, comme celles impliquées dans le tapisement de leurs parois, pouvaient provenir de l'agent pathogène et être directement impliquées dans l'envahissement et l'altération des cellules hôtes. Par ailleurs, il a été démontré que des bris prononcés des membranes des ponctuations semi-aréolées et des lamelles moyennes étaient associés à la présence de matière opaque non encadrée, celle-ci s'étendant également dans les parois secondaires pour souvent atteindre l'intérieur des cellules. Des tests cytochimiques ont montré que chez l'orme et le sumac vinaigrier (*Rhus typhina* L.) atteints de fusariose, cette matière pouvait contenir de l'ADN. En réponse à ces attaques, chez certaines plantes hôtes, de nouvelles couches pariétales peuvent se former dans les cellules de parenchyme et les fibres et même dans les éléments de vaisseaux, ainsi que dans les tissus de compartimentation, en particulier chez l'orme, chez l'œillet (*Dianthus caryophyllus* L.) atteint de fusariose et chez des plantes non hôtes inoculées avec *O. novo-ulmi* (p. ex., Rioux et Ouellette 1991, Can. J. Bot. 69 : 2074-2083; Baayen *et al.* 1996, Phytopathology 86 : 1018-1031).

Après des examens plus poussés des nombreuses micrographies sur lesquelles reposent les énoncés mentionnés ci-dessus, nous y avons découvert la présence de fines structures qui semblaient être étroitement liées aux désordres ou aux réactions cellulaires dans les plantes atteintes des maladies à l'étude. Ainsi, une relation directe entre la plus grande intensité des anomalies et l'abondance de ces structures a été perçue, ce qui était l'inverse pour les réactions cellulaires. Ces structures montraient certaines similitudes avec des composantes des noyaux et des mitochondries se trouvant chez les

1. 3413, rue de Sarnia, Québec (Québec) Canada G1X 2K5; courriel : gouellette_3@sympatico.ca

2. Faculté des sciences de l'agriculture et de l'alimentation, Université Laval, Québec (Québec) Canada G1V 0A6

3. 519, rue Givot, Québec (Québec) Canada G1B 3A1

plantes et chez les champignons pathogènes, mais elles étaient absentes du cytoplasme intact. Des structures semblables se trouvaient dans la matière tapissant les parois de vaisseaux ou dans leur lumière, dans celle reliée à la dégradation des membranes des punctuations et dans celle se profilant en abondance dans les lamelles moyennes (chez les jeunes tissus en particulier), ainsi que dans la matière opaque mentionnée ci-dessus et dans celle sécrétée par les éléments fongiques.

Pour savoir si l'on pouvait détecter des structures semblables à celles-ci dans d'autres travaux publiés par nous-mêmes ou par d'autres chercheurs, nous en avons consulté plus d'une centaine. De telles structures ont été observées dans la majorité de ces articles se rapportant à divers hôtes et organismes, certains ayant été cultivés sur des substrats stérilisés au préalable et d'autres comprenant diverses méthodes de fixation ou ayant été soumis à des traitements particuliers. L'un des principaux résultats de cet inventaire a été de constater que, pour le moins, la présence de telles structures n'était pas artificielle. Une liste représentative de ces articles est disponible dans la fenêtre « *P-elements-epilogue* » du site Web.

Le site Web comprend une discussion générale (« *General discussion* ») dans laquelle est soulignée la portée des observations mentionnées ci-haut et dont les points principaux sont les suivants. 1) Le principe des maladies à l'étude ne serait pas d'abord lié à la présence d'éléments de formes et de grosseurs régulières de l'agent pathogène, mais plutôt à des éléments montrant un contenu supposé irrégulier et qui ne sont pas toujours visiblement bien délimités par une paroi ou une membrane. Plusieurs de ces particularités ont même été démontrées en faisant croître les champignons concernés dans des conditions variées ou sur des substrats spéciaux, comme par exemple en faisant croître *O. novo-ulmi* sur des filtres Millipores, tel que mentionné ci-dessus, ou en présence de bromodéoxyuridine (BrdU) (p. ex., les parties III et V de l'article XI sur le site Web). 2) L'origine du tapisement vasculaire est avant tout attribuable à l'organisme pathogène, par le déploiement de fins éléments issus de celui-ci ou encore par les substances sécrétées par ces éléments ou par des cellules fongiques de forme plus régulière. 3) L'effet le plus évident de la maladie se trouverait dans l'altération des jeunes tissus près du cambium en l'absence de mécanismes de compartimentation ou à la suite d'attaques répétitives. 4) Même lorsque les membranes de punctuations semi-aréolées sont fortement démembrées, leurs produits de dégradation ne semblent pas se répandre abondamment dans la lumière des vaisseaux et ils ne contribuent donc pas de façon notable à son obstruction. 5) L'accumulation de matière opaque dans la périphérie des cellules de parenchyme affectées est subséquente et non antérieure à la présence de matière semblable dans ces membranes. 6) Les résultats de tests par autoradiographie après usage de thymidine tritiée et avec l'utilisation de sondes spécifiques complexées à l'or colloïdal pour localiser les substrats correspondants (avec des lectines, enzymes, anticorps polyclonaux ou monoclonaux) appuient nos énoncés.

Une réaction démontrant la présence de substances pectiques dans les éléments de vaisseau était

généralement associée à la présence de fibrilles typiques provenant de cellules paratrachéales ou de thylles (p. ex., Rioux *et al.* 1998, *Phytopathology* 88 : 494-505) et, à l'occasion, ces fibrilles s'accumulaient à l'intérieur même des cellules. On a même observé que des substances pectiques pouvaient avoir eu une action inhibitrice contre le champignon pathogène (p. ex., Ouellette *et al.* 2004, *Microsc. Microanal.* 10 : 449-461 et l'article II sur le site Web).

À la lumière de tous ces résultats, il semble que la question concernant la présence et le rôle des thylles dans le syndrome des maladies de flétrissement devrait être revue en entier étant donné que les notions inhérentes à ce sujet reposent principalement sur des observations faites en microscopie photonique ou microscopie électronique à balayage, alors que la configuration des réseaux que nous avons appelés alvéolaires peut être facilement méprise pour celle des thylles. L'auteur, dans la présentation de son travail de thèse doctorale (1960), avait déjà énoncé cette possibilité. Nous avons évoqué que ce réseau était souvent confluent et de nature similaire au tapisement mentionné ci-dessus et qu'il était d'origine fongique. Toutes ces raisons expliquent probablement pourquoi ces différences ont été reléguées à l'oubli pendant aussi longtemps. Un article publié par Foisner *et al.* (1985, *Trans. Br. Mycol. Soc.* 85 : 257-266), dont nous n'avions malheureusement plus souvenir lors de la préparation de ce site Web, vient appuyer nos dires. En effet, ces auteurs, dans leur article portant sur des champignons inoculés à des blocs de bois stérilisés au préalable et s'intitulant *Wood decay by basidiomycetes: extracellular tripartite membranous structures*, dépeignent plusieurs structures qui s'apparentent, du côté texture et allure, au réseau alvéolaire et qui, dans certains cas, paraissent être reliées à un tapisement pariétal (voir leurs Figs. 1-3 en particulier). En outre, on peut distinguer des structures similaires aux « *P-elements* » dans ce tapisement (Fig. 1) qui semble se prolonger dans les parois de la cellule voisine. Ces auteurs ont postulé avec raison que ces structures provenaient des champignons à l'étude; ils mentionnent également un fait intéressant, à savoir la présence de petits corps opaques dans le bois colonisé. Pourrait-il y avoir là une comparaison à faire avec les particules que nous avons décrites dans certains des articles présentés sur le site Web? Dans la même veine, une structure d'allure membranaire également illustrée dans une publication de Wergin (1972, *Phytopathology* 62 : 1045-1051, Fig. 3) est digne de mention.

Finalement, dans notre travail, nous nous demandons s'il ne serait pas convenable de comparer le type de développement des champignons à l'étude avec celui sous-jacent au terme « mycoplasme », décrit au début du siècle dernier, ou au terme « mycosome ». Dans l'état actuel des choses, ce dernier terme pourrait peut-être englober tout développement protoplasmique des champignons, c'est-à-dire non conforme au mode de développement observé en culture pure. Dans cette ligne de pensée, nous attirons l'attention sur la partie V de l'article XI du site Web, par rapport au recouvrement du champignon *O. novo-ulmi* à partir de filtrats de cultures liquides obtenus après passage dans des filtres Millipores de

mêmes porosités que celles mentionnées ci-dessus. Dans ce cas, la régénération du champignon est attribuable à la présence de petites particules rattachées à de courts filaments, le tout étant semblable aux éléments observés dans les éléments de vaisseau de plants d'aubergine atteints de verticilliose. Certaines colonies se développant à partir d'échantillons de filtrats ont d'abord montré des formes particulières, mais ont finalement produit des colonies typiques ou le sont devenues à la suite d'un transfert sur un nouveau milieu de culture.