

# STRUCTURAL MODIFICATION OF *Quercus eduardii* Trel. LEAF CAUSED BY *Taphrina caerulescens* (Desm. & Mont.) Tul.

## MODIFICACIÓN ESTRUCTURAL EN LA HOJA DE *Quercus eduardii* Trel. CAUSADO POR *Taphrina caerulescens* (Desm. & Mont.) Tul.

Gregg Evans<sup>1</sup>, Onesimo Moreno-Rico<sup>2\*</sup>, Petra Yáñez-Jiménez<sup>3</sup>, José de J. Luna-Ruiz<sup>4</sup>, Joaquín Sosa-Ramírez<sup>4</sup>, Celeste E. Moreno-Manzano<sup>5</sup>, Celia Jaimez-Hernandez<sup>2</sup>, Jose L. Carrasco-Rosales<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Ciencias Biológicas, Centro de Ciencias Básicas (CCB), Universidad Autónoma de Aguascalientes (UAA), Av. Universidad # 940, Col. Ciudad Universitaria, C.P. 20131, Aguascalientes, Ags., México. (evans.gregg@gmail.com). <sup>2</sup>Departamento de Microbiología, CCB, UAA, Av. Universidad # 940, Ciudad Universitaria C.P. 20131, Aguascalientes, Ags., México. (omoreno@correo.uaa.mx). <sup>3</sup>Colegio de Postgraduados, Postgrado en Botánica, Carretera México-Texcoco Km. 36.5, Montecillo, Texcoco. 56230, Estado de México. <sup>4</sup>Departamento de Disciplinas Agrícolas, Centro de Ciencias Agropecuarias, UAA, Jesús María, Ags. (joselunaruiz11@yahoo.com.mx), (jsosar@correo.uaa.mx). <sup>5</sup>CBTA 61, Aquiles Elorduy García, Calvillo, Aguascalientes, México (celesmm@hotmail.com).

### ABSTRACT

In the temperate forests of the Sierra Fria, Aguascalientes, Mexico, *Taphrina caerulescens* (Desm. & Mont.) Tul. was observed affecting leaves of *Quercus eduardii* Trel. This was the first report of the pathogen in Mexico and Central America. In addition to the typical symptom, the plant-pathogen interaction also results in the appearance of chlorotic lesions on the upper surface of some infected leaves. This was the first report of these atypical symptoms, which do not result in the formation of blisters. The main objective of this study was to describe the histopathological changes that occur in *Q. eduardii* leaves infected with *T. caerulescens*. Of the 25 species of oak present in the Sierra Fria, the disease incidence and severity was highest in *Q. eduardii*. For histopathological studies, sections of healthy and infected leaf tissue were fixed, dehydrated, embedded in paraffin, cut with a microtome and stained with fast green and safranin. The differences in the healthy and infected leaf sections were observed with a Leica DME microscope and a Carl Zeiss microscope. Leaf samples were also processed for scanning electron microscopy. The following changes were observed in the affected blister tissue: hyperplasia and hypertrophy of cells of the upper and lower epidermis and of the palisade layer cells; destruction of the cells of the spongy mesophyll layer, and destruction of the nucleus and other organelles of the palisade cells. The differences in the cell sizes between the infected and healthy leaf tissue were supported by morphometric and statistical analysis. No noticeable changes in the leaves which displayed atypical symptoms were observed.

\*Autor responsable ❖ Author for correspondence.

Recibido: agosto, 2018. Aprobado: junio, 2019.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 53: 1285-1296. 2019.

### RESUMEN

En los bosques templados de la Sierra Fría, Aguascalientes, México, *Taphrina caerulescens* (Desm. & Mont.) Tul. afecta las hojas de *Quercus eduardii* Trel. Este fue el primer reporte de este patógeno en México y América Central. Además de los síntomas característicos, la interacción planta-patógeno también genera la aparición de lesiones cloróticas en la epidermis superior de algunas hojas infectadas. Este fue el primer reporte de estos síntomas atípicos que no generan la formación de ampollas. El objetivo principal de este estudio fue describir los cambios histopatológicos que se presentan en las hojas de *Q. eduardii* infectadas con *T. caerulescens*. De las 25 especies de encinos en la Sierra Fría, la incidencia y la gravedad de la enfermedad fue mayor en *Q. eduardii*. Para los estudios histopatológicos seccionaron sanas e infectadas de tejido foliar se fijaron, deshidrataron, embebieron en parafina, cortaron con un microtomo y tiñeron con verde rápido y safranina. Las diferencias en las secciones foliares sanas e infectadas se observaron con un microscopio Leica DME y un microscopio Carl Zeiss. También procesamos las muestras foliares para el análisis de microscopía electrónica de barrido. Los siguientes cambios se observaron en el tejido con ampolla: hiperplasia e hipertrofia de las células de la epidermis superior e inferior y de las células en empalizada; destrucción de las células de la capa mesófila esponjosa y destrucción del núcleo y otros organelos de las células en empalizada. Las diferencias en el tamaño celular del tejido foliar infectado y sano se corroboraron con un análisis morfométrico y estadístico. En las hojas con síntomas atípicos no observamos cambios importantes.

**Palabras clave:** Aguascalientes, histología, tejido infectado, ampollas de hoja.

**Key words:** Aguascalientes, histology, infected tissue, leaf blisters.

## INTRODUCTION

In Sierra Fria, state of Aguascalientes, Mexico, oak trees *Quercus* spp. can be found in pure stands or mixed with pine trees *Pinus* spp., tazcate *Juniperus deppeana* Steud., manzanita *Arctostaphylos pungens* Kunth and arbutus *Arbutus* spp. All these trees are very important as they provide a wide range environmental services (CONABIO *et al.*, 2008). Moreno-Rico *et al.* (2015) observed blisters and necrotic areas on leaves of *Quercus eduardii* (Trel.) in Sierra Fria. A study of symptoms in leaves along with morphometric studies of the organism affecting them, identified the fungus *Taphrina caerulescens* (Desm. & Mont.) Tul. (Fonseca and Rodrigues, 2010). *Taphrina* diseases are better known in Europe and North America (Ellis, 2000). Leaf blister disease of *Quercus* spp. caused by *T. caerulescens* was thought to be endemic to North America. Hansen *et al.* (2007) reported all the known *Taphrina* spp. found in Central and South America; however, *T. caerulescens* was not mentioned in that list.

The most studied species is *Taphrina deformans* (Berk.) Tul. Ogawa *et al.* (1995) stated that *T. deformans* causes peach leaf curl. In peaches, the most noticeable symptoms are that leaves become severely distorted and reddish and eventually lead to premature aging and leaf abscission (Kern and Naef-Roth, 1975; Yamada *et al.*, 1990; Giosù *et al.*, 2000; Gauthier and Morgeson, 2015).

In *T. caerulescens* symptoms appear as raised areas or blisters on the upper leaf surface, and these blisters vary in size from a few millimetres to more than 1 cm; on the surface of these blisters the pathogen produces hundreds of naked asci which are filled with blastospores, a characteristic only observed in *T. caerulescens*. All other known *Taphrina* spp. produce eight ascospores within their asci. These symptoms are initially light green and eventually begin to turn brown resulting in premature death and or abscission of infected leaves; many of these changes are similar to modifications observed in peach and almond leaves infected with *T. deformans*. When the infection is severe the blisters unite and occupy and deform large areas of the leaf's surface (Mix, 1949; Taylor and Birdwell, 2000; Fonseca and Rodrigues, 2010; Kurtzman *et al.*, 2011).

## INTRODUCCIÓN

En Sierra Fría, estado de Aguascalientes, México, los encinos (*Quercus* spp.) se pueden encontrar en manchones puros o mezclados con pinos (*Pinus* spp.), tazcate (*Juniperus deppeana* Steud.), manzanita (*Arctostaphylos pungens* Kunth) y arbutus (*Arbutus* spp.). Todos estos árboles son de gran importancia ya que proporcionan numerosos servicios ambientales (CONABIO *et al.*, 2008). Moreno-Rico *et al.* (2015) observaron ampollas y zonas necróticas en las hojas de *Quercus eduardii* (Trel.) en Sierra Fría. Un estudio de los síntomas foliares junto con estudios morfométricos del organismo responsable identificó al hongo *Taphrina caerulescens* (Desm. & Mont.) Tul. (Fonseca y Rodrigues, 2010). Las enfermedades por *Taphrina* son más conocidas en Europa y América del Norte (Ellis, 2000). La enfermedad de ampollas de hoja de *Quercus* spp. causada por *T. caerulescens* se consideraba endémica de América del Norte. Hansen *et al.* (2007) reportaron todas las especies de *Taphrina* spp. en América Central y América del Sur; sin embargo, *T. caerulescens* no se mencionó en esa lista.

La especie más estudiada es *Taphrina deformans* (Berk.) Tul. Ogawa *et al.* (1995) reportaron que *T. deformans* es el agente etiológico de la verrucosis en las hojas del durazno. En los duraznos, los síntomas más evidentes se observan en las hojas, gravemente distorsionadas y rojizas, lo cual lleva al envejecimiento y caída de hojas prematuros (Kern y Naef-Roth, 1975; Yamada *et al.*, 1990; Giosù *et al.*, 2000; Gauthier y Morgeson, 2015).

Con *T. caerulescens*, los síntomas se presentan como zonas elevadas o ampollas en la epidermis superior de la hoja, el tamaño de estas ampollas varía de unos pocos milímetros a más de 1 cm; en la superficie de estas ampollas, el patógeno produce cientos de ascas desnudas llenas de blastosporas, una característica observada solo en *T. caerulescens*. Todas las especies de *Taphrina* spp. conocidas producen ocho ascosporas dentro de sus ascas. Estos síntomas empiezan como lesiones verde claro y eventualmente comienzan a tener un color marrón que genera la muerte prematura o la abscisión de hojas infectadas o ambas; muchos de estos cambios son similares a los observados en las hojas de durazno y almendro infectadas con *T. deformans*. Cuando la infección es grave, las ampollas se fusionan y ocupan y deforman grandes áreas de la superficie foliar (Mix,

These alterations in the structure of the leaf's surface caused by *T. deformans* are due to changes in the cell's shape, size, number as well as the hormonal imbalances. The combined effect of these modifications resulted in hyperplasia and hypertrophy, as described in detail by Adekunle *et al.* (2005) and Tsavkelova *et al.* (2006). In a study about the effects of *Taphrina entomospora* Thaxt. during infection of *Nothofagus*, Hansen *et al.* (2007) concluded that the pathogen follows a similar pattern, inducing hyperplasia and hypertrophy of the cells of the upper and lower epidermis, and these changes also result in distortion of the host tissue. According to the literature reviewed, researchers agree that the pathogen induces pronounced changes in the host tissue, but there is no consensus about how the fungus infects and provokes these changes.

There is little research about the interaction *T. caerulescens*-*Quercus* spp., for this reason the objective of this study was to describe the histopathological changes of *Q. eduardii* leaves infected with *T. caerulescens*.

## MATERIALS AND METHODS

### Study site and leaf sampling method

Oak leaves (two weeks after bud break) with and without blisters caused by *T. caerulescens* were collected from mark trees every 15 d during the rainy period from June to August, 2016 and 2017. A total of 20 leaves were collected from the four cardinal points of two trees in each of the four sampling location of the Sierra Fria. The sample collection locations were as follows: 22° 11' 3" N | 102° 36' 12" W; 22° 11' 19" N | 102° 36' 29" W; 22° 11' 31" N | 102° 36' 50" W; 22° 11' 51" N | 102° 37' 46" W (Monte Grande); 22° 10' 52" N | 102° 38' 35" W (Laguna Seca), and 22° 6' 11" N | 102° 41' 39" W (La Angostura). The samples were placed in clear polyethylene bags containing a moist tissue and were placed in a cooler for no more than 24 h. They were later processed at the plant pathology laboratory of the Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes.

### Processing of leaves for histological studies with optical microscope analyses

For histological preparations, specimens were first fixed in formaldehyde alcohol acetic acid, 10%: 50%: 5%+35% distilled water (F.A.A) for no less than 24 h. The samples

1949; Taylor y Birdwell, 2000; Fonseca y Rodrigues, 2010; Kurtzman *et al.*, 2011).

Estas alteraciones estructurales de la superficie foliar causadas por *T. deformans* se deben a los cambios en la forma, tamaño y número de células, así como a los desequilibrios hormonales. El efecto combinado de estas modificaciones genera hiperplasia e hipertrofia, descritas en detalle por Adekunle *et al.* (2005) y Tsavkelova *et al.* (2006). En un estudio sobre los efectos de *Taphrina entomospora* Thaxt. durante la infección de *Nothofagus*, Hansen *et al.* (2007) concluyeron que el patógeno sigue un patrón similar, induce la hiperplasia e hipertrofia de las células de la epidermis superior e inferior, y estos cambios también generan la distorsión de los tejidos del huésped. Conforme a la bibliografía revisada, los investigadores coinciden en que el patógeno induce cambios pronunciados en el tejido del huésped, pero no existe un consenso sobre cómo el hongo infecta y genera estos cambios.

La información sobre la interacción *T. caerulescens*-*Quercus* spp. es poca, y por esta razón, el objetivo de este estudio fue describir los cambios histopatológicos de las hojas de *Q. eduardii* infectadas con *T. caerulescens*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Sitio de estudio y método de muestreo de hojas

Las hojas de encino (dos semanas después de la brotación) con y sin ampollas por *T. caerulescens* se recolectaron, de árboles marcados, cada 15 d durante el periodo lluvioso de junio a agosto, 2016 y 2017. Un total de 20 hojas se recolectó de los cuatro puntos cardinales de dos árboles en cada una de las zonas de muestreo de la Sierra Fría. Las ubicaciones de las zonas de muestreo fueron: 22° 11' 3" N | 102° 36' 12" O; 22° 11' 19" N | 102° 36' 29" O; 22° 11' 31" N | 102° 36' 50" O; 22° 11' 51" N | 102° 37' 46" O (Monte Grande); 22° 10' 52" N | 102° 38' 35" O (Laguna Seca) y 22° 6' 11" N | 102° 41' 39" O (La Angostura). Las muestras se colocaron en bolsas de polietileno transparentes con un tejido húmedo y se colocaron en un refrigerador durante máximo 24 h. Las muestras se procesaron en el Laboratorio de Fitopatología de la Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes.

### Procesamiento de las hojas para los estudios histológicos con microscopía óptica

Para las preparaciones histológicas las muestras se fijaron en formaldehído: alcohol: ácido acético, 10%: 50%: 5%+35% de

were then dehydrated in an ethyl alcohol series (10, 20, 30, 50, 70, 80, 90, 100 and 100%) for 4 h in each concentration after which the samples were fixed in paraffin wax for 48 h. Transverse sections of 8 and 10  $\mu\text{m}$  were obtained using a rotary microtome. The paraffin wax was removed and the tissue was rehydrated in an ethyl alcohol series (100, 90, 80, 70%, 50, 30, 20 and 10%). The preparations were stained with safranin-fast green in order to study the effect of the parasite in its host (Johansen, 1940). All original measurements were made using an ocular micrometre ruler affixed to a compound microscope Carl Zeiss (Model Axio Lab.A1) with a 100X magnification. Measurements were made using ImageJ (Version 1.51j8; Rasband, 2017) and descriptive analyses were realized. Observations were made using a Leica DME and Carl Zeiss compound light microscope and documented with a Nikon D3000 reflex mounted on the microscope. A Blackberry z10 cell phone was used in some instances because of the excellent quality of its images.

#### Scanning electron microscopic analyses

For electron microscopic analyses of the infected tissue, leaf sections of *Q. eduardii* with and without blisters caused by *T. caerulea* were fixed in 3% glutaraldehyde pH 7.2 for 24 h. Samples were washed three times with a phosphate buffer for 1 min. Each sample was then dehydrated in series with ethanol solutions (30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 and 100%) for 15 min in each of the solutions. The last three solutions were duplicated. Samples were critically dried with CO in a Sandri-2 780A<sup>®</sup> dryer (TOUSIMIS Research Corporation, Rockville, USA). They were placed on a sample holder using a double adhesive tape of copper (or charcoal) and coated with gold for 4 min in a JFC-1100<sup>®</sup> ionizer (JEOL LTD, Tokyo, Japan). The samples were observed using a scanning electron microscope JSM-35C<sup>®</sup> (JEOL LTD, Tokyo, Japan) at the Electronic Microscopy laboratory of the Biology Department, Basic Sciences Centre of the Universidad Autónoma de Aguascalientes (Dykstra and Reuss, 2003).

## RESULTS AND DISCUSSION

### Description of disease symptoms

Typical blister symptoms were found as raised areas on the leaf upper epidermal surface, shape and size were variable and ranged from a few millimetres to more than 2 cm in diameter and in severe cases occupied the entire leaf surface. Blister were found on leaves during all stages of their development (Figure

agua destilada (F.A.A) durante mínimo 24 h. Luego, las muestras se deshidrataron en soluciones seriadas de etanol (10, 20, 30, 50, 70, 80, 90, 100 y 100%) por 4 h en cada concentración y se embebieron en parafina por 48 h. Secciones transversales de 8 y 10  $\mu\text{m}$  se obtuvieron con un microtomo rotativo. La parafina se retiró y se rehidrató el tejido en soluciones seriadas de etanol (100, 90, 80, 70, 50, 30, 20 y 10%). Las preparaciones se tiñeron con safranina-verde rápido para estudiar el efecto del patógeno en su huésped (Johansen, 1940). Todas las mediciones originales se realizaron con un ocular micrométrico acoplado a un microscopio compuesto Carl Zeiss (modelo Axio Lab.A1) con un aumento de 100X. Las mediciones se realizaron con ImageJ (Versión 1.51j8; Rasband, 2017). Las observaciones se hicieron con un microscopio de luz compuesto Leica DME y Carl Zeiss y se documentaron con una cámara réflex Nikon D3000 acoplada al microscopio. En algunos casos se usó un celular Blackberry z10 debido a la excelente calidad de las imágenes obtenidas.

#### Análisis por microscopía electrónica de barrido

Para el análisis por microscopía electrónica de barrido de los tejidos infectados, secciones foliares de *Q. eduardii* con o sin ampollas por *T. caerulea* se fijaron en una solución de glutaraldehído al 3% pH 7.2 por 24 h. Las muestras se lavaron tres veces con una solución amortiguadora de fosfatos por 1 min. Luego, cada muestra se deshidrató en soluciones seriadas de etanol (30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100%) por 15 min en cada una de las soluciones. Las últimas tres soluciones estaban duplicadas. Las muestras se secaron a punto crítico con CO en una secadora Sandri-2 780A<sup>®</sup> (TOUSIMIS Research Corporation, Rockville, EUA) y se colocaron en un soporte de muestras con una cinta adhesiva de doble cara de cobre (o carbón) y recubierta con oro por 4 min en un ionizador JFC-1100<sup>®</sup> (JEOL LTD, Tokio, Japón). Las muestras se observaron con un microscopio electrónico de barrido JSM-35C<sup>®</sup> (JEOL LTD, Tokio, Japón) en el Laboratorio de Microscopía Electrónica del Departamento de Biología, Centro de Ciencias Básicas de la Universidad Autónoma de Aguascalientes (Dykstra y Reuss, 2003).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Descripción de los síntomas de la enfermedad

Los síntomas característicos de la ampolla se observaron como zonas elevadas en la epidermis superior, la forma y el tamaño variaron de unos pocos milímetros a más de 2 cm de diámetro, y en casos graves ocupaban la superficie foliar completa. Las ampollas se encontraron en hojas durante todas las etapas de desarrollo

1A, 1B, 1C). The blisters started out as pale green to yellow, and as the leaf matured, the infected area became necrotic. A layer of asci generally formed on the upper leaf surface; however, asci also were found on the lower leaf surface.

Atypical non-blister symptoms were present as irregular, chlorotic spots on the leaf upper epidermal surface, they were variable in shape and size and ranged from a few millimetres to more than 2 cm in diameter. These spots overtime were covered by a whitish mass of asci (Figure 1D, 1E, 1F).

#### Histology of leaf section with typical blister symptoms

On comparing the section of a healthy leaf (Figure 2A) with the infected tissue of the blister area there was a marked increase in the size and number of cells (Figure 2B, 2C). Asci were emerging from the cells of both the upper and lower epidermis (Figure

(Figura 1A, 1B, 1C). Las ampollas iniciaron de color verde pálido a amarillo, y al madurar la hoja, la zona infectada se volvió necrótica. Por lo general, una capa de ascas se formó en la epidermis superior; sin embargo, también se encontraron ascas en la epidermis inferior de la hoja.

Los síntomas atípicos sin ampollas se presentaron como manchas cloróticas e irregulares en la epidermis superior, con formas y tamaños variables de unos pocos milímetros a más de 2 cm de diámetro. Con el tiempo, una masa blanquecina de ascas cubrió estas manchas (Figura 1D, 1E, 1F).

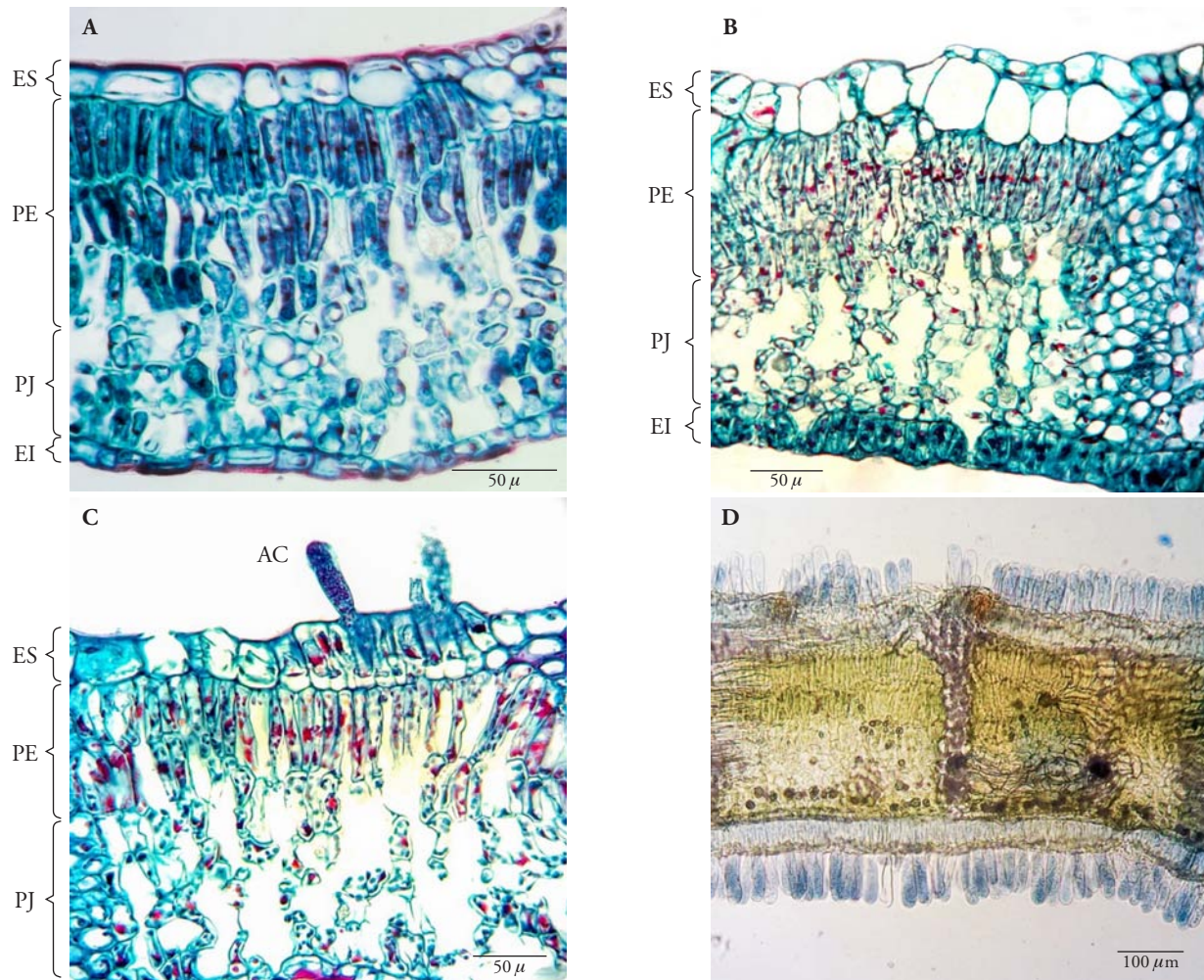
#### Histología de la sección foliar con síntomas característicos de ampollas

Al comparar la sección de una hoja sana (Figura 2A) con la ampolla de un tejido infectado, hubo un aumento significativo en el tamaño y número de células (Figura 2B, 2C). Las ascas emergían de las células



**Figure 1.** Symptoms caused by *Taphrina caerulescens* on oak leaves: A, B and C) typical blister symptoms; D, E and F) atypical symptoms.

**Figura 1.** Síntomas causados por *Taphrina caerulescens* en hojas de encino: A, B y C) síntomas característicos de las ampollas; D, E y F) síntomas atípicos.



**Figure 2.** Health and infected sections of *Quercus eduardii* leaves: A) Health section of *Quercus eduardii* leaves; B, C and D) leaf sections infected with *Taphrina caerulescens* with asci on both upper and lower leaf surface. (ES: superior epidermis; PE: palisade parenchyma; PJ: spongy parenchyma; EI: inferior epidermis).

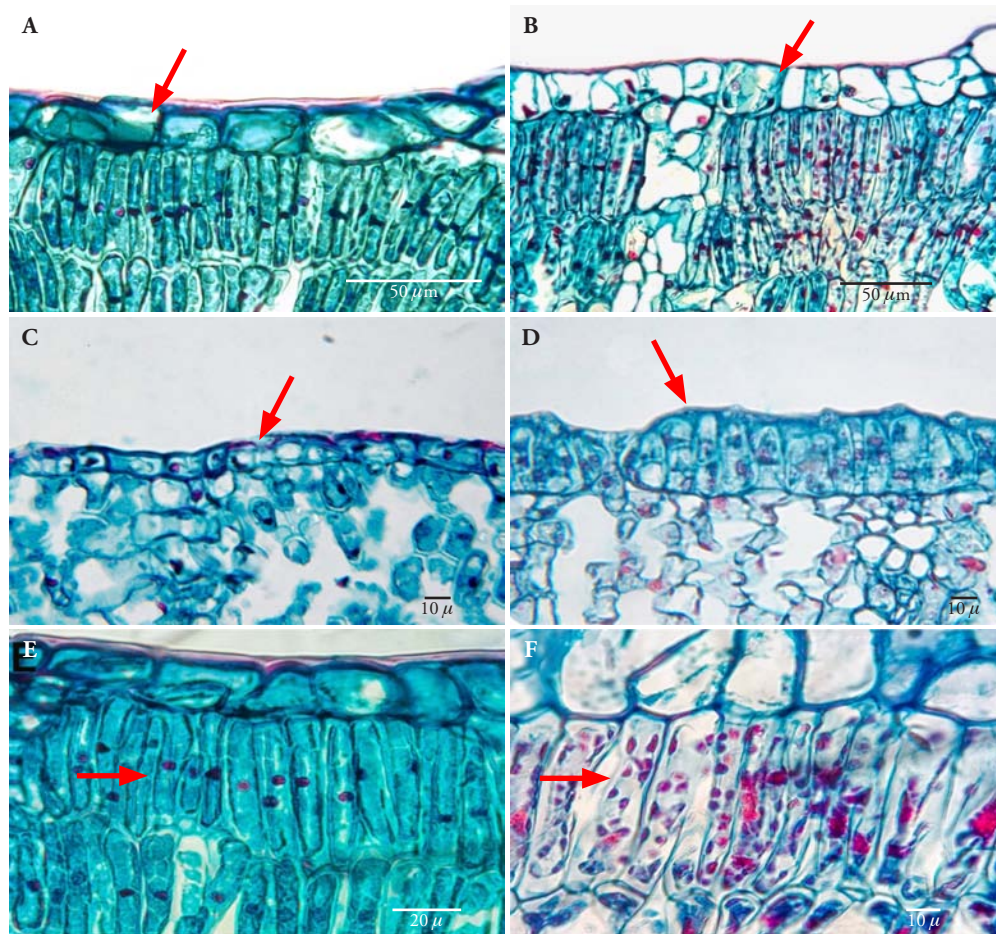
**Figura 2.** Secciones foliares sanas e infectadas de *Quercus eduardii*: A) Secciones foliares sanas de *Quercus eduardii*; B, C y D) secciones foliares infectadas con *Taphrina caerulescens* con ascas en la superficie foliar inferior y superior. (ES: epidermis superior; PE: parénquima en empalizada; PJ: parénquima esponjoso; EI: epidermis inferior).

2D). Hypertrophy and hyperplasia were observed in the cells of the upper and lower epidermis (Figure 3A, 3B, 3C, 3D). These findings are similar to observations made by Syrop (1975) in her studies of the leaf curl disease of almond caused by *T. deformans*.

Palisade cells also increased in length and in number and there was less intercellular space between the cells, their cell walls were thin and nuclei and chloroplast suffered modifications (Figure 3E, 3F). Two or three layers of palisade cells were observed. The morphometric and statistical analysis of the control and of the infected leaves confirmed that the observed changes were significant (Table 1).

de la epidermis superior e inferior (Figura 2D). En las células de la epidermis superior e inferior se observó hipertrofia e hiperplasia (Figura 3A, 3B, 3C, 3D). Estos resultados son similares a las observaciones de Syrop (1975) en sus estudios de la verrucosis del almendro por *T. deformans*.

Las células en empalizada también aumentaron su tamaño y número, el espacio intercelular disminuyó, se adelgazó la pared celular, y el núcleo y cloroplastos sufrieron alteraciones (Figura 3E, 3F). Observamos dos o tres capas de las células en empalizada. El análisis morfométrico y estadístico del control y de las hojas infectadas confirmó que los cambios observados eran significativos (Cuadro 1).



**Figure 3.** Comparison of transverse sections of healthy and infected leaf sections of *Quercus eduardii*: A) uninfected cells of the upper epidermis; B) infected upper epidermis cells; C) healthy cells of the lower epidermis; D) infected cells of the lower epidermis; E) palisade cells from healthy leaf, with dense cytoplasm and intact organelles; F) palisade cells from infected leaf section, less dense cytoplasm with damaged organelles.

**Figura 3.** Comparación de secciones transversales de hojas sanas e infectadas de *Quercus eduardii*: A) células sanas de la epidermis superior; B) células infectadas de la epidermis superior; C) células sanas de la epidermis inferior; D) células infectadas de la epidermis inferior; E) células en empalizada de hojas sanas, con citoplasma denso y organelos intactos; F) células en empalizada de secciones de hoja infectada, citoplasma menos denso con daño de organelos.

### Histology atypical symptoms

The cells of the epidermis and mesophyll layers displayed no signs of hyperplasia or hypertrophy; however, four parenchymal palisade layers were observed at times. Asci were located on the upper epidermis. Necrosis was observed in the cells of the upper epidermis and in the cells of the first layer of the palisade cells (Figure 4A, 4B), whereas cells of the spongy mesophyll appeared normal. In regions of the same leaf which did not have any symptoms, the cells were isodiametric in shape with 2-3 layers of

### Histología de síntomas atípicos

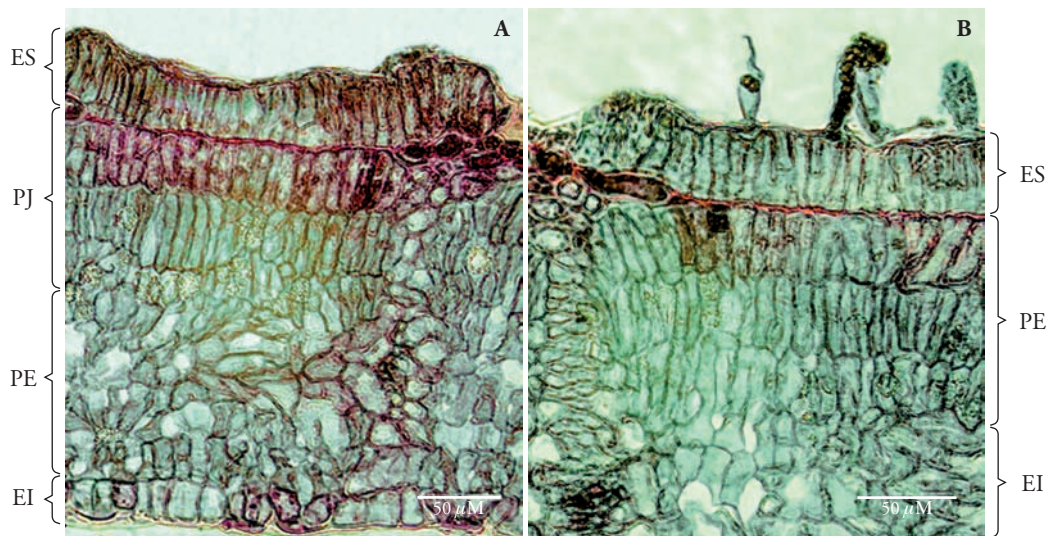
Las células de la epidermis y del mesófilo no presentaron señales de hiperplasia o hipertrofia; sin embargo, en ocasiones se observaron cuatro capas de parénquima en empalizada. Las ascas se encontraron en la epidermis superior. La necrosis se observó en las células de la epidermis superior y en las células de la primera capa de las células en empalizada (Figura 4A, 4B), mientras que las células del mesófilo esponjoso parecían normales. En regiones de la misma hoja que no presentaban ningún síntoma, las células tenían forma

**Table 1.** Morphometric parameters of cells of *Quercus eduardii* infected by *Taphrina caerulescens* with healthy cell measurements (measurements were made using 15 leaves).

**Cuadro 1.** Parámetros morfométricos de las células de *Quercus eduardii* infectadas por *Taphrina caerulescens* con mediciones de células sanas (se usaron 15 hojas para las mediciones).

Parameters	Status	Mean ( $\mu\text{m}$ ) (N=30)	SD	Difference between means
Upper epidermal cells length	Healthy	28.58	4.71	7.09
	Infected	35.67	11.37	
Upper epidermal Cells width	Healthy	25.75	6.44	16.66
	Infected	42.41	13.91	
Lower epidermal cells length	Healthy	12.16	1.43	8.92
	Infected	21.08	3.39	
Lower epidermal cells width	Healthy	14.83	5.29	4.79
	Infected	19.62	4.52	
Palisade cells length	Healthy	43.41	6.55	11.34
	Infected	54.75	6.54	

SD: Standard Deviation.



**Figure 4.** Atypical symptoms of *Taphrina caerulescens* affecting *Quercus eduardii* leaf: A) longitudinal section of an infected zone of *Quercus eduardii* showing necrosis of the upper epidermis and the first layer of the palisade parenchyma; B) *Taphrina caerulescens* ascus forming from ascogenous cells inserted between epidermal cells of *Quercus eduardii*.

**Figura 4.** Síntomas atípicos de *Taphrina caerulescens* en hojas de *Quercus eduardii*: A) sección longitudinal de una zona infectada de *Quercus eduardii* con necrosis en la epidermis superior y la primera capa del parénquima en empalizada; B) ascas de *Taphrina caerulescens* formadas a partir de las células ascógenas insertadas entre las células de la epidermis de *Quercus eduardii*.

palisade parenchyma cells and two layers of spongy parenchyma; cells of the epidermis were normal in size and shape, all of which fits the description of normal uninfected tissue as already described in Figure 2A. The presence of tannins was also observed in unaffected epidermal and sub epidermal cells close to the areas with atypical symptoms.

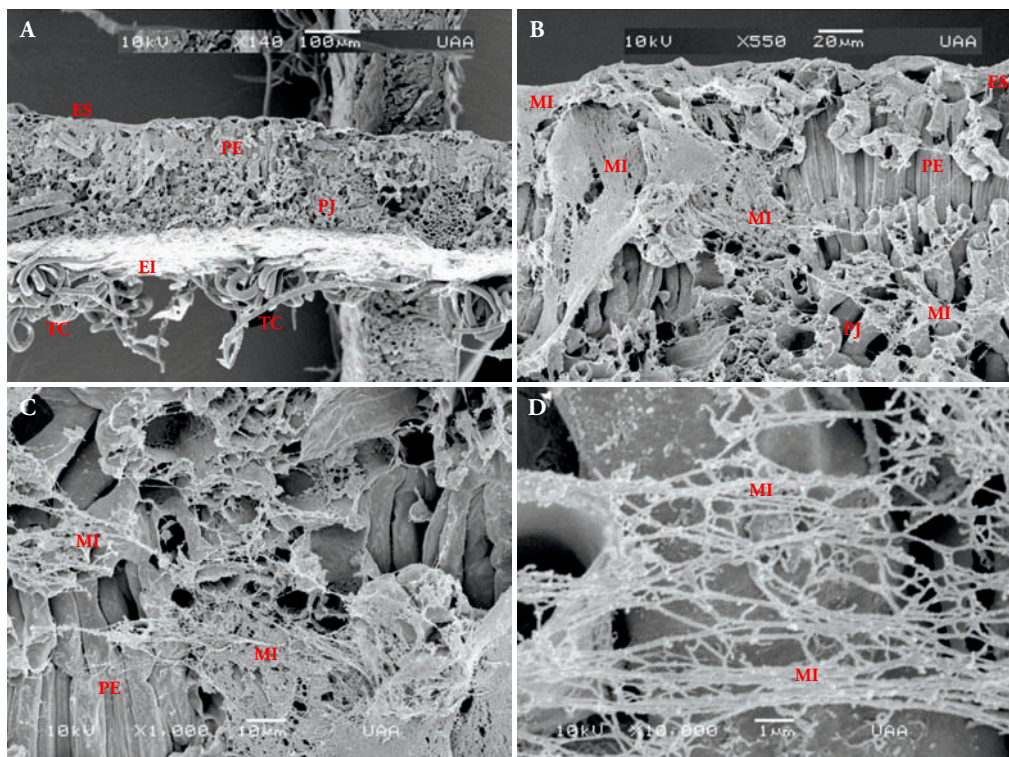
### Scanning electron microscopy analyses

These analyses were done using tissue from the typical blister symptoms. The mycelium of *T. caerulescens* was observed infecting the leaves of *Q. eduardii* as follows: subcuticular, intercellular and also within the walls of the epidermis of its host (Figure 5A, 5B and 5C). These results were similar to those published by Syrop (1975) in her studies

isodiamétrica con 2-3 capas de células del parénquima en empalizada y dos capas de parénquima esponjoso; las células de la epidermis tenían un tamaño y forma normales, lo que coincide con la descripción de tejido normal no infectado en la Figura 2A. La presencia de taninos también se observó en las células normales de la epidermis y subdermis, cerca de las zonas con síntomas atípicos.

### Análisis por microscopía electrónica de barrido

Estos análisis se realizaron en el tejido obtenido de los síntomas característicos de la ampolla. El micelio de *T. caerulescens* se observó infectando las hojas de *Q. eduardii* así: subcuticular, intercelular y dentro de las paredes de la epidermis de su huésped (Figura 5A, 5B y 5C). Estos resultados fueron similares a los publicados



**Figure 5.** SEM of *Taphrina caerulescens* on *Quercus eduardii*: A) and B) Longitudinal section of *Quercus eduardii* infected with *Taphrina caerulescens*, showing the mycelium of *Taphrina caerulescens*; C) and D) Mycelium of *Taphrina caerulescens*, measuring  $<0.2 \mu\text{m}$ , colonizing the entire leaf section of *Quercus eduardii* in the infected zone. (ES: Superior epidermis; EI: Inferior epidermis; MI: mycelium; PE: Palisade cells; PJ: Spongy mesophyll; TC: Trichome).

**Figura 5.** Micrografía electrónica de barrido de *Taphrina caerulescens* en *Quercus eduardii*: A) y B) Sección longitudinal de *Quercus eduardii* infectado con *Taphrina caerulescens*, se observa el micelio de *Taphrina caerulescens*; C) y D) Micelio de *Taphrina caerulescens*,  $<0.2 \mu\text{m}$ , colonizando la sección foliar completa de *Quercus eduardii* en la zona infectada. (ES: Epidermis superior; EI: Epidermis inferior; MI: micelio; PE: Células en empalizada; PJ: mesófilo esponjoso; TC: Tricoma).

of *T. deformans* in almond leaves. In our study the mycelium of *T. caerulescens* first colonized the cells of the lower epidermis and then the entire internal leaf tissue (Figure 5A and 5B); besides, the asci of *T. caerulescens* developed on both the adaxial and abaxial surfaces. This is in contrast with observations made by Syrop (1975) and Bassi *et al.* (1984), who observed asci developing on the adaxial side of leaves (Figure 6). The mycelium of *T. caerulescens* was extremely slender (Figure 5C and 5D)  $<0.2 \mu\text{m}$ .

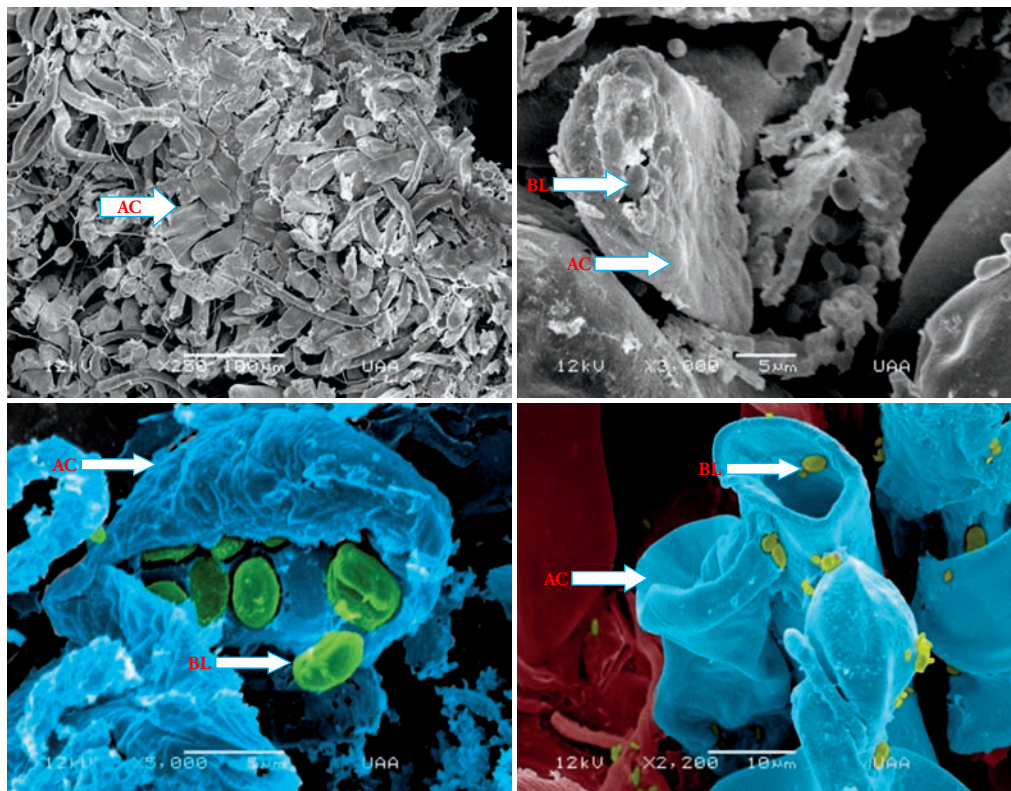
### Displacement of *Taphrina caerulescens* through *Quercus eduardii* leaf

On penetrating the leaves of its host, the fungus begins to aggressively modify host cells, first with cells of the lower epidermis (Figure 2B, 3D) and, as fungus progresses through the leaf, most of the cells of the spongy mesophyll were destroyed (Figure 2B, 2C, 2D), cells of the palisade layer increased significantly in length and number and displayed a thinning of their cell walls, protoplast appeared less dense than

por Syrop (1975) en sus estudios de *T. deformans* en hojas de almendro. En nuestro estudio, el micelio de *T. caerulescens* primero colonizó las células de la epidermis inferior y después el tejido foliar interno completo (Figura 5A y 5B); además, las ascas de *T. caerulescens* se desarrollaron en la superficie adaxial y abaxial. Esto en contraste con las observaciones de Syrop (1975) y Bassi *et al.* (1984), quienes observaron el desarrollo de las ascas en la superficie adaxial de las hojas (Figura 6). El micelio de *T. caerulescens* era extremadamente delgado (Figura 5C y 5D)  $<0.2 \mu\text{m}$ .

### Desplazamiento de *Taphrina caerulescens* a través de la hoja de *Quercus eduardii*

El hongo, al penetrar las hojas de su huésped, comienza a modificarlas de forma agresiva; primero las células de la epidermis inferior (Figura 2B, 3D) y, conforme el hongo avanza a través de la hoja, destruye la mayoría de las células del mesófilo esponjoso (Figura 2B, 2C, 2D), las células de la capa empalizada aumentan significativamente su tamaño y número y



**Figure 6.** Scanning electron micrographs (SEM) showing the development of asci of *Taphrina caerulescens* on the lower epidermis of *Quercus eduardii*. (A, B, C and D) Scanning electron micrographs (SEM) showing the development of asci of *Taphrina caerulescens* on the abaxial surface of *Quercus eduardii*. (BL: Blastospores; AC: Ascus).

**Figura 6.** Desarrollo de ascas en la epidermis inferior de *Quercus eduardii*: A, B, C y D) Scanning electron micrographs (SEM) showing the development of asci of *Taphrina caerulescens* on the abaxial surface of *Quercus eduardii*. (BL: Blastosporas; AC: Asca).

in the control, the nuclei and other organelles were modified or destroyed. Cells of the upper epidermis also drastically increased in number and size. These changes brought about by *T. caerulescens* in the host leaves are very similar to changes observed in peach leaves infected with *T. deformans* which causes hypertrophy and hyperplasia, and then deformation, premature death and premature abscission of leaf blades (Syrop, 1975).

There were no differences in the anatomical parts of the leaf blade near the blisters and other unmodified parts of the leaf. In both cases, in the cross section of the leaf blade, the typical leaf cell system was visible and unchanged.

### CONCLUSIONS

This study provided evidence that *T. caerulescens* causes hypertrophy and hyperplasia of cells of the upper epidermis, lower epidermis and of the palisade layer cells of *Q. eduardii* leaves. The morphometric and statistical analysis confirmed that the differences observed in health cells and infected cells were significant, and that these differences were directly related to the infection by *T. caerulescens*. The plant-pathogen interaction also resulted in the destruction of cells in spongy mesophyll layer. Eventually, it also destroyed the nucleus and other organelles in the infected cells. Also, for the first time, this study describes the atypical symptoms (lesions) also formed on leaves infected with the pathogen. These symptoms do not involve the formation of blisters on *Q. eduardii* leaves.

### ACKNOWLEDGEMENTS

Authors acknowledge Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Mexico) and Universidad Autónoma de Aguascalientes for providing the funding for this research and, besides, Mr. Francisco Juarez Reyes a retired forest ranger of Aguascalientes, for his dedication to our cause.

### LITERATURE CITED

- Adekunle, A. A., N. U. Uma, and A. M. Oleah. 2005. Studies on coloured Leaf Spot Disease of *Alchornea cordifolia* caused by *Taphrina deformans*. *Plant Pathol. J.* 4: 150-156.
- Bassi, M., G. G. Conti, and N. Barbieri. 1984. Cell wall degradation by *Taphrina deformans* in host leaf cells. *Mycopathologia.* 88: 115-125. <https://doi.org/10.1007/BF00436441>

se observa el adelgazamiento de su pared celular, el protoplasto parece menos denso que en el testigo, los núcleos y otros organelos son modificados o destruidos. Las células de la epidermis superior también aumentan significativamente en número y tamaño. Estos cambios provocados por *T. caerulescens* en las hojas del huésped son muy similares a los cambios observados en las hojas de durazno infectadas con *T. deformans*, lo que causa hipertrofia e hiperplasia, y luego deformación, muerte y abscisión prematuras de las hojas (Syrop, 1975).

No hubo diferencias en las partes anatómicas de la hoja próximas a las ampollas y otras partes no modificadas de las mismas. En ambos casos, en la sección transversal de la hoja, el sistema celular característico de la hoja era visible y sin cambios.

### CONCLUSIONES

Este estudio proporciona evidencia de que *T. caerulescens* genera la hipertrofia e hiperplasia de las células de la epidermis superior e inferior y de la capa de células en empalizada de las hojas de *Q. eduardii*. El análisis morfométrico y estadístico confirmó que las diferencias observadas en células sanas e infectadas eran significativas, y que estas diferencias tienen relación directa con la infección por *T. caerulescens*. La interacción planta-patógeno también provocó la destrucción de las células del mesófilo esponjoso. Eventualmente, también destruyó el núcleo y otros organelos en las células infectadas. Además, por primera vez, este estudio describe los síntomas atípicos (lesiones) en las hojas infectadas con el patógeno. Estos síntomas no involucran la formación de ampollas en las hojas de *Q. eduardii*.

—Fin de la versión en Español—



- CONABIO (Comisión nacional para el conocimiento y uso de la biodiversidad)–IMAE (Instituto del medio ambiente del estado de Aguascalientes)–UAA (Universidad Autónoma de Aguascalientes). 2008. *La Biodiversidad en Aguascalientes: Estudio de Estado.* 389 p.
- Dykstra, M. J., and L. Reuss. 2003. *Biological Electron Microscopy: Theory, Techniques and Troubleshooting.* Kluwer Academic/Plenum. New York, USA. 534 p.
- Ellis, H. A. 2000. Fungus-induced galls on alder catkins. *Field Mycol.* 1: 78-80.
- Fonseca, Á. Á., and M. G. Rodrigues. 2010. *Taphrina* Fries.

- In: Kurtzman, C. P., J. W. Fell, and T. Boekhout (eds). The Yeasts: A Taxonomic Study. (5th ed). Elsevier. Amsterdam. pp: 823-858.
- Gauthier, N. W., and D. Morgeson. 2015. Peach Leaf Curl and Plum Pockets. <https://plantpathology.ca.uky.edu/files/ppfs-fr-t-01.pdf>
- Giosù, E. S., G. Spada, V. Rossi, G. Carli, and I. Ponti. 2000. Forecasting infections of the leaf curl disease on peaches caused by *Taphrina deformans*. Eur. J. Plant Pathol. 106: 563-571.
- Hansen, P. V., M. V. Bianchinotti, and M. Rajchenberg. 2007. Anatomy and cytology of *Taphrina entomospora* during infection of *Nothofagus*. Mycol. Res. 111: 592-598.
- Johansen, D. A. 1940. Plant Microtechnique. McGraw-Hill, New York, USA. 523 p.
- Kern, H. and S. Naef-Roth. 1975. Zur Bildung von Auxinen und Cytokininen durch *Taphrina*-Arten. J. Phytopathol. 83: 193-222.
- Kurtzman, C. P., J. W. Fell, T. Boekhout, and V. Robert. 2011. Methods for isolation, phenotypic characterization and maintenance of yeasts. In: Kurtzman, C. P., J. W. Fell, and T. Boekhout. (eds). The Yeasts. A Taxonomy Study. Elsevier, Amsterdam. pp: 87-110
- Mix, A. J. 1949. A monograph of the genus *Taphrina*. University of Kansas Science Bulletin 33: 3-167.
- Moreno-Rico, O., J. G. Marmolejo-Monsivais, C. E. Moreno-Manzano, y K. Pérez Hernández. 2015. Primer reporte de *Taphrina caerulescens* en *Quercus* spp. de la Sierra Fría de Aguascalientes. Memorias del XI Congreso Nacional de Micología. México. pp: 133-134.
- Ogawa, J. M., E. I. Zehr, G. W. Bird, D. F. Ritchie, K. Uriu, and Y. K. Uyemoto. 1995. Compendium of Stone Fruit Diseases. APS. USA. 98 p.
- Rasband, W. 2017. ImageJ. U.S.A: National Institute of Health, USA.
- Syrop, M. 1975. Leaf-curl disease of almond caused by *Taphrina deformans* (Berk) Tul. I. A light microscope study of the host-parasite relationship. Protoplasma 85: 39-56.
- Taylor, J., and D. O. Birdwell. 2000. A scanning electron microscopic study of the infection of water oak (*Quercus nigra*) by *Taphrina caerulescens*. Mycologia 92: 309-311.
- Tsavkelova, E. A., S. Y., Klimova, T. A., Cherdyntseva, and A. I. Netrusov. 2006. Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: A review. Appl. Biochem. Microbiol. 42: 117-126.
- Yamada, T., Tsukamoto, H., Shiraishi, T., Nomura, T., and H. Oku. 1990. Detection of indole acetic acid biosynthesis in some species of *Taphrina* causing hyperplastic diseases in plants. Jap. J. Phytopathol. 56: 532-540.