

**Quantitative resistance in the
weed-pathosystem
Senecio vulgaris L.-*Puccinia lagenophorae* Cooke**

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZÜRICH
for the degree of
DOCTOR OF NATURAL SCIENCES

presented by

GABRIELA SIMONE WYSS

Dipl. bot.

University of Zürich (Switzerland)

born August 23, 1966

citizen of Zürich

accepted on the recommendation of

Prof. M. S. Wolfe, examiner

Prof. H. Müller-Schärer, co-examiner

Dr. J. Frantzen, co-examiner

Zürich, 1997

ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit wurden die Mechanismen der quantitativen Resistenz des Gemeinen Kreuzkrautes (*Senecio vulgaris* L.) gegenüber dem Rostpilz *Puccinia lagenophorae* Cooke untersucht und die Bedeutung für die biologische Bekämpfung diskutiert. Dieser Pflanzen-Krankheitserreger Wechselwirkung liegt die Strategie des sogenannten „system management approach“ der biologischen Unkrautbekämpfung zugrunde. *S. vulgaris* ist als Problemunkraut im Obst-, Wein- und Gartenbau aber auch in Baumschulen bekannt. Der Rostpilz *P. lagenophorae*, wahrscheinlich aus Australien und Neuseeland stammend, wurde in den frühen sechziger Jahren zum ersten Mal in Europa nachgewiesen.

Im Rahmen einer Feldstudie in der Schweiz im Jahre 1993 wurde die Anzahl Pestizidanwendungen bei 29 verschiedenen Standorten im Gemüse-, Obst- und Weinbau sowie in Baumschulen und auf einem Ruderalstandort erfasst. Die dabei festgestellte Verteilung und Häufigkeit der Kreuzkraut- und Rostpilzpopulationen wurde beschrieben (Kapitel 2). Während der ganzen Beobachtungszeit waren Pflanzenpopulationen mit Dichten variierend zwischen 16 bis 4000 Pflanzen m⁻² nachweisbar. Ab Juni konnte der Rostpilz auf der Hälfte der Standorte, sogar unter hohem Fungiziddruck und bevorzugt an älteren Pflanzenstadien, gefunden werden. Neben dem Mehltaupilz *Erysiphe fischeri* Blumer waren keine weiteren biotrophen Pilzarten nachweisbar.

Vor Beginn der experimentellen Arbeit, wurden je eine Inzuchtlinie des Kreuzkrautes und des Rostpilzes aus der Schweiz, den Niederlanden und Grossbritannien selektioniert und unter kontrollierten Bedingungen über mehrere Generationen randomisiert kultiviert (Appendix). Dadurch sollte verhindert werden, dass genetische Variabilität durch umweltbedingte Faktoren überdeckt wird und der Einfluss der Mutter (maternal effects) auf die Nachkommenschaft übertragen und mitgemessen wird.

Kenntnisse über die Aeciosporendifferenzierung, das Eindringen und die Verbreitung des Pilzes auf *S. vulgaris* waren nicht vorhanden. Der Infektionsprozess des Pilzes wurde deshalb eingehend im zeitlichen und räumlichen Verlauf mit Hilfe der Licht-, Fluoreszenz- und Rasterelektronenmikroskopie studiert (Kapitel 3). Aeciosporen keimten innerhalb von vier Stunden nach Inokulation (n.I.) aus und das Appressorium wurde bis spätestens 8 h n.I. bevorzugt über Zellzusammenschlüssen gebildet. Der Pilz penetrierte direkt in die Epidermiszelle mittels eines kurzen Penetrationskegels. In Einzelfällen (<1-2%) durchwuchs der Pilz auch zufällig eine Spaltöffnung. Solche Hyphen wurden jedoch im Interzellulär-

raum abgestoppt. Nach spätestens 16 h bildete sich der Penetrationskegel in der Epidermiszelle zu einem intra-epidermalen Vesikel aus, das sich, abgetrennt durch ein Septum, zur primären Hyphe weiterentwickelte. 48 h n.I. konnten kleinere Kolonien beobachtet werden, deren Hyphen jedoch aus der Zelle herauswuchsen und sich zwischen den Zellen verbreiteten. In den Mesophyllzellen waren 6 Tage nach Inokulation monokaryotische Haustorien zu beobachten und nach 9 Tagen brachen die Aecidienlager durch die Epidermiszellschicht.

Durch die erworbenen Kenntnisse konnte der Infektionsprozess von *P. lagenophorae* mit Hilfe einer Komponentenanalyse quantifiziert werden (Kapitel 3). Dazu wurden die folgenden Stadien in der pilzlichen Entwicklung bestimmt: 1) ungekeimte Spore, 2) gekeimte Spore, 3) Appressorium, 4) Penetrationskegel, 5) intra-epidermales Vesikel, und 6) primäre Hyphe. Anschliessend wurden die Fraktionen der Uebergänge sich nachfolgender Stadien berechnet. Die Komponentenanalyse ermöglicht den Nachweis von Hemmstufen im pilzlichen Infektionsverlauf innerhalb des Wirtsgewebes. So können zwischen Pflanzenlinien oder Pflanzenentwicklungsstadien Unterschiede hinsichtlich Resistenz festgestellt werden.

Nach der Inokulation der oben beschriebenen drei Pflanzenlinien im Zwei-, Vier- und Fünfblattstadium durch eine Schweizer Rostlinie, zeigte sich, dass ältere Pflanzenstadien eine signifikant höhere Sporendichte cm^{-1} auf dem ersten echten Blattpaar im Vergleich zu jüngeren Stadien aufwiesen. Die stärkste Hemmung innerhalb des Infektionsprozesses zeigte sich im Uebergang von Appressorium zu Penetrationskegel und der Variationskoeffizient war hier überdies am grössten. Auf der Schweizer Pflanzenlinie wurden signifikant weniger Penetrationskegel gebildet als auf den anderen Linien. Der Nachweis, dass sich die Schweizer Linie resistenter verhielt gegenüber der Niederländischen und der Britischen konnte auch für den Uebergang von Sporen zu primären Hyphen (=„efficacy“) erbracht werden.

In weiteren Studien wurde der Einfluss eines ausgewählten Netzmittels, Tween 60, und die Art und Weise der Sporenanwendung (Trockenapplikation mittels eines Sporenturmes versus Nassapplikation mittels eines DeVilbiss Handzerstäubers) auf Unterschiede in der Anfälligkeit einer Schweizer und einer Niederländischen Pflanzenlinie gegenüber einer Schweizer Rostlinie untersucht (Kapitel 4). Die Komponentenanalyse zeigte beim Stadium der Sporenanhaftung, dass Tween 60 das Abrollen von Wassertropfen und miteingeschlossenen Sporen auf dem Blatt nicht verhindern konnte, was auf die schlechte Benetzung der Blattoberfläche zurückgeführt werden könnte. Tween 60 hatte jedoch keinen Ein-

fluss auf die Ausbildung des Penetrationskegels. Auf die Anwendung eines Netzmittels wurde in den nachfolgenden Experimenten verzichtet. Die statistische Analyse zum Stadium der Sporenhaftung und „efficacy“ erbrachte den Nachweis einer signifikanten Interaktion „Pflanzenlinie*Applikation“, was darauf hinwies, dass der Einfluss der Applikation von der getesteten Pflanzenlinie abhängig ist. Die Trockenapplikation erwies sich als stabil und eher kontrollierbar im Bezug auf Sporenhaftung im Gegensatz zur Nassapplikation, welche die Bedingungen auf dem Feld weniger gut simuliert und eher künstlich wirkt.

Resultate hinsichtlich der Abklärung ob das Abschneiden oder Nichtabschneiden eines Blattes als Methodenvorgabe die Krankheitsentwicklung beeinflusst, enthüllten einen interessanten Aspekt, der in den „system management approach“ integriert werden könnte (Kapitel 4). Pflanzen, die durch die Niederländische Rostlinie infiziert wurden reagierten mit einer erhöhten Anfälligkeit. So wäre es möglich, Pflanzen nach einer Rostinokulation zusätzlich durch Abmähen zu verletzen, um die Anfälligkeit des übriggebliebenen Pflanzengewebes gegenüber dem Pilz zu erhöhen. Da das Abschneiden eines Blattes die Resistenz der getesteten Pflanzenlinien nicht erhöhte, was zunächst erwartet wurde, wurde die Schneidemethode für die mikroskopischen Beobachtungen weiterpraktiziert.

In drei wiederholten Experimenten, ausgeführt unter kontrollierten Bedingungen, wurde der Einfluss von zwei Rostpilzlinien (rCH I und rNL II) auf zwei Inzuchtlinien von *S. vulgaris* in der vierten Generation (pCH I und pNL II) sowohl im Zweiblatt- als auch im Vierblattstadium mittels Komponentenanalyse untersucht. In allen drei Experimenten konnte rassennichtspezifische quantitative Resistenz nachgewiesen werden. Unterschiede in der Resistenzausprägung wurden bei folgenden Stadien festgestellt: 1) bei der Sporenhaftung, 2) bis zur Ausbildung der primären Hyphen, und 3) zwischen der Ausbildung der primären Hyphen und offenen Sori. Die Schweizer Pflanzenlinie war bei allen getesteten Stadien gewöhnlich resistenter als die Niederländische, ausser beim Stadium der offenen Sori im Experiment 1. Das Krankheitsniveau auf der Schweizer Pflanzenlinie war am Ende der Untersuchungsperiode höher als auf der Niederländischen Linie, obschon das Niveau bei allen vorangegangenen Stadien jeweils geringer war. Diese Umkehrung konnte auch bei Anwendung des Netzmittels Tween 60 und bei den Applikationstechniken gefunden werden. Die phenotypisch geprägte Resistenz in der Wirtspflanze scheint sehr durch Umweltbedingungen veränderbar zu sein. Weitere Gründe dafür könnten sein, dass 1) die pilzliche Entwicklung auf der Niederländischen Pflanzenlinie gehemmt und die Wahrscheinlichkeit für das Ueberleben von Kolonien aufgrund von Wachs-

tumskompensation in der Pflanze verringert wurde, oder, dass 2) die Rostentwicklung zwischen dem Stadium der primären Hyphen und offenen Sori auf der Schweizer Linie beschleunigt wurde. In Experiment 1 verursachte die Niederländische Rostlinie mit 0.41 eine signifikant grössere Fraktion der Blattfläche, die mit Myzel bedeckt ist, verglichen mit 0.31 durch die Schweizer Rostlinie. In den Experimenten 2 und 3 konnte kein signifikanter Einfluss durch den Faktor Rostlinie festgestellt werden, doch verursachte die Niederländische Rostlinie einen vergleichbaren Befall wie die Schweizer Linie, obschon weniger Sporen auf das Blatt gelangten.

In einem weiteren Experiment wurden drei *S. vulgaris* Inzuchtlinien in der vierten Generation mit vier Rostlinien infiziert (Kapitel 6). Zur Zeit der Inokulation waren die Pflanzen sowohl im Zwei- als auch im Vierblattstadium. Die verschiedenen Wirt-Krankheitserreger Interaktionen zeigten ein breites Spektrum an Resistenzausprägung, ausgedrückt als Fraktion der Blattfläche, die von Myzel bedeckt ist (0.13-0.33). Keiner der Genotypen war vollständig resistent oder vollständig anfällig. Somit konnten die Ergebnisse aus dem vorangegangenen Kapitel zumindest mit den ausgewählten Pflanzen- und Krankheitserregerlinien bestätigt werden, wobei rassenunspezifische Resistenz nachgewiesen wurde. Die Niederländische Pflanzenlinie war die anfälligste verglichen mit den übrigen Linien, und die Niederländische Rostlinie war die aggressivste auf allen drei Pflanzenlinien.

In Kapitel 6 wurde eine Zusammenfassung hinsichtlich des Einflusses von Pflanzenstadien auf die Ausprägung der Resistenz erstellt, welcher je nach Experiment unterschiedlich ausfiel (Kapitel 6). Es scheint, dass Umgebungsfaktoren eine wichtige Rolle spielen. Jüngere Pflanzenstadien waren gewöhnlich weniger stark befallen (in fünf von sieben Fällen) als ältere Stadien, ausgedrückt in der Blattfläche, welche mit Myzel bedeckt ist. Die Feldstudie zeigte zudem *S. vulgaris* Populationen, die sehr heterogen in Bezug auf Pflanzenstadien waren. Quantitative Resistenz bedeutet nun, dass eine geringe Sporenproduktion auf jungen Stadien im Gegensatz zu einer hohen Sporenproduktion auf älteren Stadien zu erwarten ist. Der Sporenaustausch zwischen Pflanzen im Zweiblatt- und solchen im Vierblattstadium kann so garantiert werden und die biologische Bekämpfung von Kreuzkraut wird nicht eingeschränkt.

Kurzfristig betrachtet kann das Krankheitsniveau auf allen untersuchten Genotypen durch die Niederländische Rostlinie erhöht werden (Kapitel 5 und 6) und es könnte sich unter günstigen Umweltbedingungen eine Epidemie entwickeln. Trotz der erhöhten Aggressivität der niederländischen Rostlinie, waren

Einflüsse des Faktors „Pflanzenlinie“ in der statistischen Analyse nachweisbar. Längerfristig könnten resistenter Genotypen unter dem Einfluss einer aggressiven Pilzlinie ausselektiert werden. Das Krankheitsniveau des resistentesten Genotypen wird deshalb über die erfolgreiche Stimulierung einer Epidemie entscheiden. Noch sind keine Resultate über das notwendige Krankheitsniveau, das ausreichend Inokulum zur epidemischen Krankheitsentwicklung garantiert, verfügbar.

Im Kapitel 7 wurden die Resultate zusammengefasst und hinsichtlich der biologischen Unkrautbekämpfung, insbesondere von *S. vulgaris* mit dem Rostpilz *P. lagenophorae*, diskutiert. Quantitative Resistenz schränkt die Anwendung von Pilzen in der biologischen Unkrautbekämpfung nicht ein. Um die Resistenz im untersuchten System zu überwinden, könnte die Sporensuspension mit einem niedrigdosierten Herbizid versetzt werden. Dieser zusätzliche Stressfaktor könnte den Einfluss des Krankheitserregers erhöhen. In zukünftigen Studien sollte zunächst der Schwellenwert des Krankheitsbefalles, bei dem genügend Sporenausstoss zur Stimulierung einer Epidemie erwartet werden kann, definiert werden. Weitere Arbeiten sollten zur Abklärung der Wichtigkeit der Inokulumdichte, Sporenproduktion und -applikation vorgenommen werden.

SUMMARY

Quantitative resistance of *Senecio vulgaris* L. to the rust fungus *Puccinia lagenophorae* Cooke was investigated in terms of mechanisms and relevance for biological control following the system management approach. *S. vulgaris* is considered to be a „problem“ weed in horticulture, viticulture, fruit-growing and tree nurseries. The rust originated probably from Australia and New Zealand and was first described in the early 1960's in Europe.

In a field survey in Switzerland in 1993, the pesticide input on plant and rust populations from 29 different sites (vegetable crops, orchards, vineyards, tree nurseries and one ruderal area) was determined and abundance and distribution was described (chapter 2). Throughout the whole observation period, *S. vulgaris* populations were observed at densities from 16 to 4000 plants m⁻². From June on, the rust fungus occurred at half of the sites even under frequent use of fungicides and was observed frequently at older plant stages of *S. vulgaris*. No biotrophic parasites were detected other than the rust fungus and the powdery mildew fungus *Erysiphe fischeri* Blumer.

Prior to experimental work, uniform plant lines and pure rust lines originating from Switzerland, the Netherlands and Britain were selected and cultivated randomly and for several generations under controlled conditions to reduce environmental factors confounding genetic variation (appendix).

There was no information about aeciospore differentiation, penetration and invasion of the rust fungi on *S. vulgaris*. Therefore the infection process of *P. lagenophorae* was studied temporally and spatially using light, fluorescence and scanning electron microscopy (chapter 3). Aeciospores germinated within 4 h after inoculation (a.i.) and an appressorium was formed mostly over anticlinal cell junctions at 8 h a.i. The host was penetrated directly into the epidermal cell by a short penetration peg. In a few cases, <1-2 %, sporelings entered the stomatal opening but the hyphae continued growing intercellularly and then ceased. Within the epidermal cell, the peg elongated and formed an intra-epidermal vesicle at 16 h. a.i. This was later separated from a primary hypha by a septum. By 48 h a.i. an incipient colony was observed from which hyphae left the cell and grew in the intercellular space. At 6 days a.i. during colony extension, monokaryotic haustoria were visible within the mesophyll cells. At 9 days a.i., aecia were produced and erupted through the epidermal layer.

Based on these findings, the infection process was quantified using component analysis (chapter 3). Thereby the following stages were defined: 1) total number of spores, 2) germinated spore, 3) appressorium, 4) penetration peg, 5) intra-epidermal vesicle, and 6) primary hypha. Moreover, the fractions of transitions of successive phases were computed. This approach provides a tool for determination of possible inhibition at certain phases of the fungal development in the host tissue which could reveal differences in resistance among plant lines and plant developmental stages. When the three plant lines described above were inoculated at the second, fourth and fifth leaf stage by a Swiss rust pathogen line, older plant stages had a higher spore density cm^{-1} on their first true leaf pair than plants inoculated at a younger stage. The most sensitive transition was from appressorium to penetration peg and the coefficient of variation was highest at this transition. The Swiss plant line allowed the formation of significantly fewer pegs compared to the other lines. The evidence that the Swiss plant line was more resistant than the Dutch and British lines was also confirmed for the next stage: the fraction of spores that formed primary hyphae (defined as efficacy).

In further studies, the influence of a selected adjuvant, Tween 60, and application techniques, i.e. dry application using a settling tower vs. wet application using a DeVilbiss hand duster, were investigated on differences in susceptibility of the Swiss and Dutch plant lines to the Swiss rust pathogen line (chapter 4). Component analysis at the stage of spore adherence revealed that run-off of spores suspended in Tween 60 was not reduced. It was assumed that this was due to poor wettability of the leaf surface. There was no apparent influence of Tween 60 on penetration peg formation. The use of an adjuvant was rejected therefore for further experiments. A highly significant interaction of „plant line by application technique“ was detected at the stage of spore adherence and on efficacy, indicating that the effect of application technique was specific for a certain plant line. Dry application was considered to be more reliable and stable in contrast to wet application which is more artificial and simulates field conditions to a lesser extent.

The results considering the question whether or not leaf cutting as a method affects disease development detected an interesting aspect which could be integrated into the system management approach (chapter 4). When plants were inoculated with the Dutch rust line but not with the Swiss rust line the effect of cutting resulted in higher susceptibility of all plant lines tested. It could be possible, so far, to injure plants post-inocula-

tion to increase susceptibility of the remaining host tissue to the rust fungus, for example, by mowing of the upper part of the plants. Because cutting did not increase resistance of the plant lines, as might be expected, the method of cutting leaves for microscopical observations was further used in following experiments.

In three replicated experiments in the climate room, the influence of two pure rust pathogen lines (rCH I and rNL II) on two inbred plant lines at the fourth generation (pCH I and pNL II) and at a younger and older plant stage was investigated using component analysis (chapter 5). In all three experiments there was evidence of race-nonspecific quantitative resistance. Differences in resistance were detected 1) at spore adherence, 2) until the formation of primary hyphae, and 3) between the formation of primary hyphae and open sori. At all stages tested, the Swiss plant line was usually more resistant than the Dutch except at the stage of open sori in experiment 1. Although infection at previous stages was less on the Swiss plant line, the final disease level was higher compared to the Dutch plant line. This reversal was found also in the experiments considering the use of an adjuvant and dry vs. wet application. The phenotypic expression of resistance in the host seemed to be modified markedly by environmental factors. Other reasons could be that 1) the fungal development on the Dutch plant line was inhibited and the probability of colony survival was less due to compensation effects or 2) rust development between the phases primary hypha and open sorus was accelerated on the Swiss plant line. In experiment 1, the Dutch rust line caused a significant larger fraction of mean leaf area occupied by mycelium (0.41), compared to 0.31 caused by the Swiss. In experiment 2 and 3, there was no significant effect of rust line, but the Dutch line was able to compensate to an equal level of disease despite fewer spores deposited.

In a following experiment, a set of three inbred *S. vulgaris* lines from Switzerland, the Netherlands and the UK at the fourth generation were exposed to four pure *P. lagenophorae* lines (chapter 6). The plants were at the second leaf stage and the fourth leaf stage at the time of inoculation. A wide range of variation in resistance expressed as the fraction of leaf area occupied by mycelium from 0.13-0.33 was observed. There was neither a complete resistant nor a fully susceptible genotype. At least in the framework of the host and pathogen lines tested, the results from the previous chapter were confirmed where race-nonspecific quantitative resistance was detected. The

Dutch plant line was the most susceptible compared to the other lines, and the Dutch rust line was the most aggressive on all three plant lines.

An overview over all experiments revealed that there was an influence of plant stage on resistance to the rust which may vary in its expression (chapter 6). It is likely that environmental factors play a major role. Plants at a younger leaf stage at the time of inoculation were usually less infected (five of seven cases) with respect to leaf area occupied by mycelium than plants at an older stage. The field survey demonstrated *S. vulgaris* populations which were heterogeneous with respect to plant developmental stage. Quantitative resistance provided at least reduced spore production on younger plant stages in contrast to higher spore production on plants at older stages. Therefore spore transfer may still be supported and biological control of *S. vulgaris* might not be restricted.

On a short-term scale in the control of *S. vulgaris*, the level of disease might be increased as demonstrated for the rNL II (chapter 5 and 6) and epidemics would be stimulated under certain environmental conditions. In spite of differences among rust pathogen lines in aggressiveness, plant line effects were still evident. On a long-term scale, more resistant genotypes would be selected under the influence of aggressive rust pathogen lines. The lowest infection level of the most resistant genotype decides the success of development of epidemics in the system management approach. There is no information available yet about the level of disease which provides sufficient spore inoculum for the development of epidemics.

In chapter 7, the results of the present studies were summarized and discussed with respect to the biological control of weeds and in particular of *S. vulgaris* by the rust *P. lagenophorae* (chapter 7). Quantitative resistance does not restrict the use of fungi in biological weed control. To overcome resistance in the pathosystem considered it is suggested to combine a spore suspension with a chemical herbicide at low dosage. This additional stress factor may increase the effect of the pathogen. For future studies it will be basic to define the threshold level of disease severity at which sufficient spore multiplication will be insured to stimulate epidemics. More information should be collected about the importance of inoculum density, about spore production and spore application.