



Doctoral Thesis

Genetic variation, spatial distribution, and reproductive biology of pseudoflower-forming rust fungi (*Uromyces pisi* and relatives) on *Euphorbia cyparissias*

Author(s):

Pfunder, Monika

Publication Date:

1999

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-003836492> →

Rights / License:

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

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

Diss. ETH No. 13331

**Genetic variation, spatial distribution, and reproductive
biology of pseudoflower-forming rust fungi (*Uromyces pisi*
and relatives) on *Euphorbia cyparissias***

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH

for the degree of
DOCTOR OF NATURAL SCIENCES

presented by

Monika Pfunder

Dipl. Natw. ETH

born Juli 27, 1970

citizen of Neuhausen a. Rhf. (SH)

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. B.A. Roy, examiner

Dr. J.A. Shykoff, co-examiner

Dr. A. Leuchtman, co-examiner

1999

1 SUMMARY

Insects play a major role in many fungal life cycles, either as vectors to transmit the fungus to a new host, or as "pollinators" to transfer the gametes of fungi among mating types. Some rust fungi of the genera *Puccinia* and *Uromyces* use flower-like traits to attract insect "pollinators". Plants infected by these fungi are generally inhibited from flowering. Instead, they are induced to form pseudoflowers, rosettes of yellow leaves that are clustered on top of the stem in a flower-like shape. Not only do fungal pseudoflowers visually resemble true flowers, but just like true flowers, they present a sweet-smelling nectar that is produced by the fungus on the surface of the host leaves. The nectar contains fungal gametes (spermatia) that are transferred by nectar-feeding insects.

Rusts of the species complex *Uromyces pisi* (Pers.) Wint. produce pseudoflowers on cypress spurge, *Euphorbia cyparissias* L. Although they were suspected to be dependent on insects for their reproduction, no study has been done so far to confirm this assumption. By conducting an insect-exclusion experiment, I was able to show that fungal sexual reproduction does rely on insect vectors (chapter 4).

In the course of the insect exclusion experiment, I observed a conspicuously high number of ants on the fungal pseudoflowers, as well as on the non-infected flowering host plants. Stéphanie Schürch, a diploma student, joined with me to study the role of ants as "pollinators" of non-infected and infected *Euphorbia* plants. We showed that ants were able to pollinate the non-infected *E. cyparissias* plants, however, they did not fertilise the fungus (chapter 5).

Flying insects, especially flies and solitary bees, visited often and moved freely among non-infected host flowers and fungal pseudoflowers. Therefore, I hypothesised that pseudoflowers and true flowers might interact through these "pollinators" by either competing for insects or by facilitating each others' visits. An artificial array experiment showed that true flowers were strongly preferred over pseudoflowers, however, no influence on the visitation rates among the two species could be observed when pseudoflowers and true flowers co-occurred in mixtures (chapter 4). In a non-manipulative field study I then measured the reproductive success of pseudoflowers and true flowers in combination with the density and frequency of neighbouring pseudoflowers and true flowers. This study, in contrast to the array experiment, showed that pseudoflowers were serious competitors for true flowers, whereas pseudoflowers were not seriously influenced by non-infected hosts (chapter 6).

Although it is known that the species complex *U. pisi* consists of 11 described species that all induce pseudoflowers on *E. cyparissias*, I never distinguished among the different species in the experiments described above. The reason for this was that the fungal species are morphologically indistinguishable on *E. cyparissias*. Only after successful

fertilisation through insects do they switch to another host. The taxonomy of the different species is based on the choice of this alternate host, as well as on the shape and surface of teliospores produced on this host. For further studies on the ecology of these rusts it will be indispensable to be able to differentiate them while they produce pseudoflowers. I therefore used a molecular method, sequencing the internal transcribed spacer region (ITS) in the rDNA, to identify the different species. The ITS region has been found to be appropriate for phylogenetic analyses of other fungi, and also provided valuable markers for the study on *Uromyces*. I was able to isolate DNA from five different species in the *U. pisi* complex, as well as from two species in the closely related species complex *Uromyces scutellatus*. Phylogenetic analyses suggested that *Uromyces scutellatus*, a microcyclic fungus with a simple life cycle of only 2-3 spore stages, may have evolved from the macrocyclic ancestors in the *U. pisi* species complex (chapter 7). I further applied this molecular method to evaluate the species distribution of *U. pisi* within and among *E. cyparissias* populations in Switzerland. Although I found five different species of *U. pisi* on Fabaceae, only two of them were also isolated from freshly collected *E. cyparissias* (*U. pisi* s.s. and *U. striatus*). One further species was identified on *E. cyparissias* from a herbarium specimen. *U. pisi* s.s. and *U. striatus* were co-occurring within the same host population and were both found at elevations from 500 to 2000 m (chapter 7).

2 ZUSAMMENFASSUNG

Bei vielen Pilzen spielen Insekten eine grosse Rolle im Lebenszyklus, unter anderem als Vektoren zur Übertragung eines Krankheitserregers auf andere Wirtspflanzen oder als "Bestäuber" zur Übertragung von Gameten zwischen verschiedenen Geschlechtstypen. Einige Rostpilze aus den Gattungen *Puccinia* und *Uromyces* benutzen blütenähnliche Strukturen, um Insekten als "Bestäuber" anzulocken. Die Infektion durch diese Pathogene führt zu einer drastischen Veränderung der Morphologie der Wirtspflanze. Die Blütenbildung von infizierten Pflanzen wird verhindert und statt dessen bilden sie durch den Einfluss des Pathogens sogenannte Pseudoblüten. Pseudoblüten sind Rosetten von durch die Infektion gelb gewordenen Sprossblättern, die an der Spitze eines Triebes gebildet werden und ein blütenähnliches Aussehen besitzen. Aber Pseudoblüten sehen nicht nur aus wie richtige Blüten, sie präsentieren auch Nektar, der vom Pilz auf der Blattoberfläche gebildet wird. Dieser Nektar enthält Pilz-Gameten, die von den Nektar fressenden Insekten transportiert werden.

Rostpilze des Formenkreises *Uromyces pisi* (Pers.) Wint. bilden Pseudoblüten auf Zypressen-Wolfsmilch, *Euphorbia cyparissias* L. Obwohl man schon lange vermutet hat, dass diese Pilze für ihre Fortpflanzung von Insekten abhängig sind, ist bisher noch keine Studie bekannt geworden, die diese Annahme bestätigt. Ich habe diese Hypothese mit einem Insekten-Ausschluss-Experiment testen und bestätigen können (Kapitel 4). Im Verlauf dieser Studie ist mir aufgefallen, dass auffällig viele Ameisen auf gesunden sowie auf kranken Wirtspflanzen zu sehen waren. Stéphanie Schürch, eine Diplomandin, arbeitete mit mir zusammen, um die Rolle der Ameisen als „Bestäuber“ zu studieren. Wir konnten zeigen, dass Ameisen zwar die gesunden Wirte bestäuben, aber keinen Einfluss auf die Fortpflanzung der Pilze haben (Kapitel 5).

Fliegende Insekten, vor allem Fliegen und Solitärbiene, konnten oft beobachtet werden, wie sie sowohl Pseudoblüten als auch richtige Blüten von *E. cyparissias* nacheinander besuchten. Ich stellte deshalb die Hypothese auf, dass Pseudoblüten und Blüten von *E. cyparissias* durch diese Insekten interagieren könnten, entweder durch Konkurrenz für Insektenbesuche, oder aber durch erhöhte Besuchsraten beider Arten aufgrund einer insgesamt höheren Blütendichte. Ein Experiment mit künstlich angelegten gemischten Populationen von Pseudoblüten und Blüten zeigte, dass die Insekten eindeutig die gesunden Blüten bevorzugten. Es konnte allerdings kein Einfluss der einen Art auf die Besuchsraten der anderen festgestellt werden (Kapitel 4). Eine Studie in einer natürlichen Population zeigte allerdings, dass gesunde Wirtspflanzen weniger Samen produzierten, wenn sie während ihrer Blühphase von Pseudoblüten umgeben waren. Pseudoblüten dagegen schienen durch die Präsenz von gesunden Blüten nicht beeinträchtigt (Kapitel 6).

Obwohl bekannt ist, dass der Formenkreis *U. pisi* aus mindestens 11 verschiedenen Pilzarten auf *E. cyparissias* besteht, habe ich in den oben beschriebenen Experimenten nie zwischen den einzelnen Pilzarten unterschieden, weil eine morphologische Identifizierung auf *Euphorbia* nicht möglich ist. Erst nachdem sie erfolgreich von Insekten "bestäubt" wurden und zu einer anderen Wirtspflanze (eine Art aus der Familie der Fabaceen) gewechselt haben, wird es möglich, die einzelnen Arten aufgrund von Sporenmerkmalen und Wirtswahl zu bestimmen. Allerdings ist es für zukünftige Studien zur „Bestäubungs“-Biologie und Ökologie solcher Pseudoblüten unerlässlich, dass man die verschiedenen Pilzarten auch in diesem Stadium unterscheiden kann. Ich verwendete deshalb eine molekulare Methode, die die Differenzierung verschiedener Pilzarten ermöglichen sollte. Ich sequenzierte die ITS Region (internal transcribed spacer region) von einzelnen, eindeutig identifizierten Pilzarten, die auf einem Fabaceen Wirt gefunden wurden, und verglich die DNA von Pseudoblüten mit derjenigen von den identifizierten Arten. Ich konnte fünf verschiedene Arten des *U. pisi* Formenkreises auf Fabaceen unterscheiden, fand aber nur zwei davon in während der Arbeit gesammelten Pseudoblüten (*U. pisi* s.s. and *U. striatus*). Eine weitere Art wurde auf *E. cyparissias* identifiziert, diese stammte jedoch von einem Herbarbeleg. *U. pisi* s.s. and *U. striatus* traten in derselben *E. cyparissias* Wirtspopulation auf und wurden von 500 - 2000 müM gefunden (Kapitel 7). Zudem fand ich zwei weitere Pilzarten aus dem mikrozyklischen Formenkreis *Uromyces scutellatus*. Phylogenetische Analysen lassen vermuten, dass diese beiden mikrozyklischen Arten aus makrozyklischen Arten aus dem Formenkreis *U. pisi* entstanden sind (Kapitel 7).