Biologische Unkrautbekämpfung: Resistenzmechanismen

Gabriela S. WYSS, Eidgenössische Forschungsanstalt für Obst-, Wein- und Gartenbau (FAW), CH-8820 Wädenswil
aktuelle Adresse: 1453 Fifield Hall, PO Box 110680, Plant Pathology Department, University of Florida, Gainesville, FL 32611-0680, e-mail: wyss@gnv.ifas.ufl.edu
Heinz MÜLLER-SCHÄRER, Département de Biologie/Ecologie, Université de Fribourg, Pérolles, CH-1700 Fribourg

Im Rahmen eines europäischen Gemeinschaftsprojektes (COST 816) wird neben anderen wichtigen Unkräutern *Senecio vulgaris* als Modellpflanze zur biologischen Bekämpfung untersucht. Ein in der Schweiz eingeschleppter Rostpilz kommt als potentieller Krankheitserreger in Frage. Anhand einer Dissertation der ETH Zürich, in Zusammenarbeit mit der Universität Fribourg und der FAW, wurden die Resistenzmechanismen von *S. vulgaris* gegenüber dem Rostpilz *Puccinia lagenophorae* untersucht und ihre Bedeutung im Hinblick auf Möglichkeiten einer biologischen Bekämpfung diskutiert.

Senecio vulgaris L. (Gemeines Kreuzkraut; Abb. 1), zeigte als erste Pflanzenart überhaupt Resistenz gegenüber Triazin-Herbiziden (Abb. 2). In der Schweiz haben wir vor allem in Kulturen Probleme, wo die Palette der bewilligten Herbizide eingeschränkt ist und/oder nur Herbizide mit geringer Wirkung gegenüber *S. vulgaris* (z.B. Harnstoff-Derivate) appliziert werden dürfen. Die kurze Generationszeit, verbunden mit hoher Samenproduktion, rascher Samenkeimung nach einer Bodenbearbeitung während des ganzen Jahres, sowie gute Flugfähigkeit des Samens sind Eigenschaften für eine erfolgreiche und schnelle Besiedelung neuer Standorte. Eine Ertragsreduktion aufgrund von direktem Einfluss von Kreuzkraut konnte in Sellerie (Müller-Schärer und Rieger 1998), in Karotten (Wyss 1995) und anderen Kulturen gezeigt werden. Das Gemeine Kreuzkraut wurde daher als Modellpflanze zur Abklärung von populationsbiologischen und -genetischen Aspekten von Pflanzen-Pathogen Beziehungen ausgewählt (Müller-Schärer und Wyss 1994).

Rostpilz: potentieller Regulationsorganismus

S. vulgaris wird neben anderen obligat biotrophen Krankheitserregern durch den

Abb. 1. ▶ *Senecio vulgaris* L. (Gemeines Kreuzkraut), Problemunkraut in mehr als 40 verschiedenen Kulturen in 65 Ländern weltweit.

Abb. 2. ▼ Monokultur von herbizidresistenten *S. vulgaris*-Pflanzen im Spargelanbau. Herbizidresistenz ist eines der Hauptprobleme, wodurch *S. vulgaris* zum Problemunkraut wird. Problemstandorte finden sich im Obst- und Gartenbau, in Baumschulen, in Rebbergen und in Containerkulturen (Müller-Schärer und Wyss 1994).

wirtstreuen Rostpilz *Puccinia lagenophorae* Cooke (Uredinales, Basidiomycetes) befallen. Dieser höchst wahrscheinlich aus Australien und Neuseeland stammende Pilz wurde in den frühen sechziger Jahren nach Frankreich eingeschleppt und in der Schweiz erstmals 1962 durch Mayor (1962) erwähnt. Innerhalb kurzer Zeit hat er sich in ganz Mitteleuropa, auf den Britischen Inseln und Irland verbreitet. In Europa können verschiedene wildwachsende *Senecio*-Arten befallen werden. In Gewächshaus- und Freilandstudien konnten *Calendula officinalis*, *Bellis perennis* und *S. cruentus* infiziert werden. Aus Australien sind zudem Infektionen an *Erechtites*-Arten und *Lagenophora billardieri* Cass. beschrieben (Wilson *et al.* 1965). Der Lebenszyklus ist im Gegensatz zu Getreiderosten stark limitiert (Abb. 3). Die Aecidienlager und später die typisch orange gefärbten Aecidiosporen vom Typ der Vermehrungssporen sind auf Blättern, Stengeln und Blütenköpfchen zu finden (Abb. 4). Dieser Befall führt zu starken Verformungen der Pflanze, die zu einer Reduktion der Photosynthese und zu einem gleichzeitigen Anstieg der Respiration und einer Sequestrierung der Assimilate führt.

Glossar

Aecidie: Vermehrungsspore; eine von fünf Sporentypen im Lebenszyklus eines Rostpilzes
Appressorium: Haftorgan eines Pilzes im Hinblick auf Sporenhaftung am Blatt
Basidien: Träger der Basidiosporen
Basidiosporen: Sexuell gebildete Sporen der Rostpilze
Haustorie: pilzliches Organ in der Wirtspflanzenzelle; spielt eine Rolle bei der Nahrungsaufnahme
Hyphe: fädiges Vegetationsorgan
inokulativ: eine von mehreren Anwendungsstrategien in der biologischen Unkrautbekämpfung; der Schadorganismus stammt aus dem Ursprungsgebiet des Problemunkrautes, kann sogar ein anderer Kontinent sein, und muss vor seiner Einsetzbarkeit unter strengen Bestimmungen geprüft werden
Mesophyll: Blattgewebe
Mycel: Pilzgeflecht; Gesamtheit aller Hyphen
obligat biotroph: im Hinblick auf die Nahrungsaufnahme abhängig von anderen lebenden Organismen
Pathogen: Organismus, der Krankheit erzeugt
Pathosystem: Untereinheit in einem Ökosystem, das Parasitismus beinhaltet
Pyknidien: Asexuell gebildete Sporen der Rostpilze
Septum: Querwand in einer Hyphe
Sequestrierung: hier gebraucht als Ausnutzung von pflanzlichen Assimilaten durch den Pathogen
Sorus/Sori: Sporenhaufen (-pusteln) an der Blattoberfläche
Teleutosporen: Überdauerungsspore; eine von fünf Sporentypen im Lebenszyklus eines Rostpilzes
Vesikel: zu einem Bläschen ausgebildete Hyphe im pflanzlichen Gewebe

Anwendungen in der biologischen Bekämpfung

Unter biologischer Unkrautbekämpfung versteht man den gezielten Einsatz von natürlichen Feinden, wie Insekten, Pilze, Viren usw., zur Reduktion und Langzeitstabilisierung der Zielunkraut-Dichte unter deren ökonomische Schadensschwelle. Das Ziel ist somit nicht eine Eliminierung von unerwünschten Pflanzen, sondern vielmehr das Wirken der eingesetzten Organismen als zusätzlichen Stressfaktor. Unkrautfreie Habitate können bekannterweise zur Etablierung von schwieriger zu bekämpfenden Arten führen. Neben den in der Literatur ausführlich beschriebenen inokulativen und inundativen Anwendungsstrategien der biologischen Unkrautbekämpfung ist der «system management approach» (Müller-Schärer und Frantzen 1996) eine weitere Strategie, an der anhand der Modellpflanze *S. vulgaris* intensiv gearbeitet wird. Diese Strategie beinhaltet die Manipulation des Pathosystems und versucht das Gleichgewicht zwischen Wirtspflanze und Pathogen zugunsten des Pathogens zu verschieben. Der Erfolg soll sich durch die Stimulierung einer Krankheitsepidemie auf der Zielunkrautpopulation einstellen und somit die Wettbewerbfähigkeit des Unkrautes massiv reduzieren. Der Hauptfaktor, der die erfolgreiche Anwendung des «system management approach» in der Praxis einschränken kann, und den Gebrauch von Pilzen generell in der biologischen Unkrautbekämpfung, ist die Krankheitsresistenz gegenüber pilzlicher Infektion in der Wirtspflanzenpopulation. Resistenz kann eine mögliche Epidemie verzögern und verlangsamen.

Die erfolgreiche Anwendung der geplanten Kontrollstrategie verlangt deshalb unter anderem (1) genaue Kenntnisse des Infektionsprozesses des Pilzes, um mögliche Resistenzmechanismen zu lokalisieren, (2) eine Quantifizierung der Interaktionen zwischen verschiedenen europäischen Pflanzen- und Rostlinien sowie (3) eine Charakterisierung der Resistenzmechanismen.

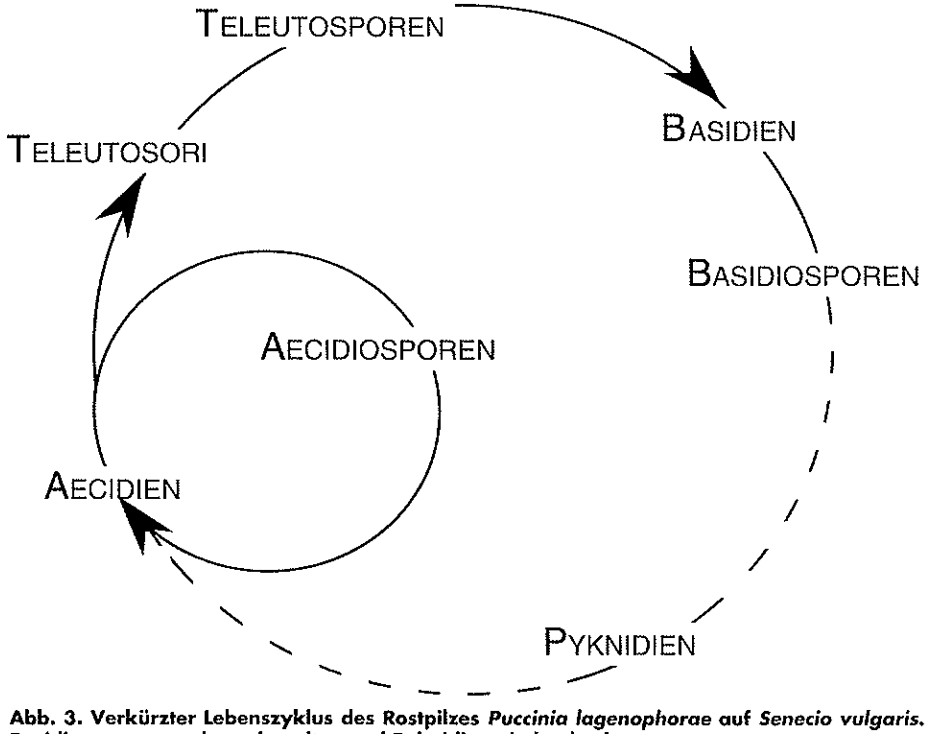


Abb. 3. Verkürzter Lebenszyklus des Rostpilzes *Puccinia lagenophorae* auf *Senecio vulgaris*. Basidiosporen wurden sehr selten und Pyknidien nie beobachtet.

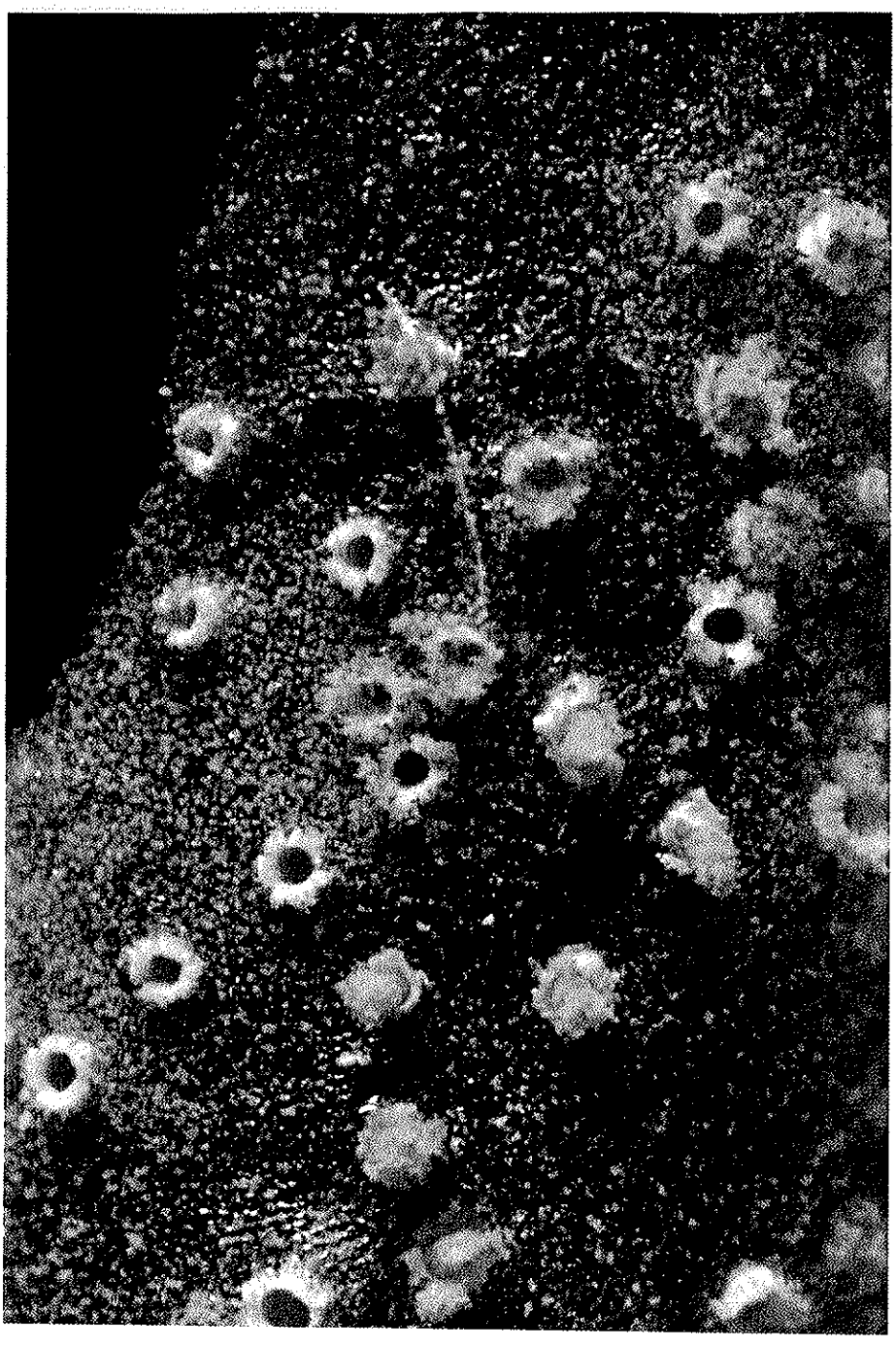


Abb. 4. Sori mit austretenden Aecidiosporen sowie Teleutosporenlagern (schwarze Flekken) auf *S. vulgaris*. Aecidiosporen wurden für alle Experimente verwendet.

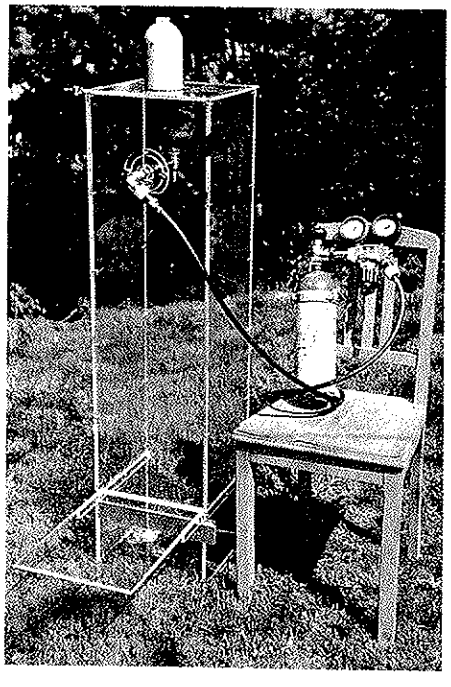


Abb. 5. Sporenapplikationsturm. Die Aecidiosporen wurden trocken in den mit einer kleinen Öffnung im Deckel versehenen Messingbehälter (Pfeil) gefüllt und mittels Druckluft nach oben geschleudert. Gleichmässig fallen die Sporen auf Pflanzen oder mit Agar beschichtete Objekträger.

Pilzlicher Infektionsprozess

Im Rahmen einer Dissertation (Wyss 1997) wurden nun einerseits grundlegende Untersuchungen zum Infektionsprozess des bis anhin noch nie detailliert beschriebenen Rostpilzes gemacht und anschliessend eine Methode erarbeitet und angewendet, um die Resistenzmechanismen der Wirtspflanze gegenüber dem Pilz zu beschreiben und das Potential einer biologischen Bekämpfung abzuschätzen. Dabei wurde mit je drei Pflanzenlinien aus der Schweiz, aus Holland und England sowie den entsprechenden Rostlinien aus Einzelsporenkulturen gearbeitet, um phänotypische und genetische Variation innerhalb den Linien zu reduzieren und genetische Variation zwischen den Linien zu erkennen. Die Sporen wurden in allen Experimenten jeweils trocken mit Hilfe eines Sporenturms (Abb. 5) appliziert, um möglichst quantitativ arbeiten zu können. Mit Hilfe von verschiedenen Anfärbetechniken bezüglich der pilzlichen Organe im pflanzlichen Gewebe und entsprechend der Licht-, Fluoreszenz- und Elektronenmikroskopie wurden die einzelnen Entwicklungsstadien des Pilzes eingehend untersucht.

Im Gegensatz zu Getreiderosten zeigt *P. lagenophorae* einige Eigenheiten bezüglich einerseits des Eindringens und andererseits der Etablierung in der Pflanze. Nach der Keimung bildet der Pilz einen kurzen Keimschlauch aus, der mittels eines Septum (Querwand) vom eigentlichen Haftorgan auf der Blattoberfläche, dem Appressorium, getrennt ist (Abb. 6). Anstelle des üblichen Eintretens durch Spaltöffnungen penetriert *P. lagenophorae* direkt mittels eines kurzen Penetrationskegels in die Epidermiszelle.

In nur 1 bis 2 % aller beobachteten Eindringungsversuche fand der Keimschlauch eine Spaltöffnung. In diesen Fällen jedoch hörte die Hyphe auf zu wachsen und der Penetrationsversuch scheiterte.

Anschliessend bildet sich ein Vesikel aus, das wiederum durch ein Septum, von der weiter auswachsenden, primären Hyphe abgetrennt ist (Abb. 7). Weitere Hyphen bilden sich aus, wachsen aus der Epidermiszelle heraus und interzellulär weiter (Abb. 8). Ungewöhnlich ist zudem die späte Haustorienbildung in geringer Anzahl (Abb. 9). Neun Tage nach Sporenkeimung waren die Aecidienlager ausgebildet und brachen durch die Epidermisschicht durch. Teleutosporenlager etablierten sich frühestens zwei Wochen nach dem Durchbrechen der Aecidienlager (Abb. 4).

Quantifizierung des Infektionsprozesses

Zur weiteren Abklärung möglicher Abwehr von *S. vulgaris* gegenüber dem Rostpilz schien es sinnvoll, die verschiedenen Stadien des Infektionsprozesses genauer

zu untersuchen, um mögliche Resistenzmechanismen festzustellen (Wyss und Müller-Schärer 1995). So wurden die drei Pflanzenlinien im Zwei- und Vierblattstadium mit der Schweizer Rostlinie inokuliert. Mit Hilfe der «Komponenten-Analyse» (Zadoks und Schein 1979) lassen sich Abwehrmechanismen in ihre Komponenten unterteilen und diejenigen Stadien des Infektionsprozesses festhalten, wo das Abwehrsystem des Wirtes zu wirken beginnt und das pilzliche Wachstum gehemmt wird. Der wichtigste Resistenzmechanismus zeigte sich beim Übergang vom Appressorium zum Penetrationskegel (Abb. 10), worauf auch die reduzierte Anfälligkeit von *S. vulgaris* gegenüber dem Pilz zurückgeführt werden kann. Dieser Übergang war zudem stark abhängig von den untersuchten Pflanzenlinien. Die Schweizer Pflanzenlinie war resistenter in bezug auf die Ausbildung von Penetrationskegeln als die anderen Linien. Von diesen Resultaten lässt sich weiter folgern, dass der Abwehrmechanismus in oder an der Epidermiszelle zu suchen ist. Diese Studie zeigte zudem, dass *S. vulgaris*-Blätter mit zunehmendem Alter anfälliger werden.

Tab. 1. Quantitative rassenunspezifische Resistenz bei *S. vulgaris*, infiziert mit *P. lagenophorae*. «Disease severity» (mit Myzel durchwachsene Blattfläche) der drei Pflanzenlinien Schweiz, Holland und England unter Einfluss der drei entsprechenden Rostlinien

Rostlinien Pflanzenlinien	UK	CH I	NL II	Mittel
CH I	0,14±0,02°	0,13±0,02	0,21±0,03	0,16±0,01
UK	0,17±0,03	0,15±0,03	0,23±0,03	0,17±0,01
NL II	0,22±0,03	0,32±0,02	0,33±0,02	0,27±0,02
Mittel	0,18±0,02	0,20±0,02	0,26±0,02	0,21

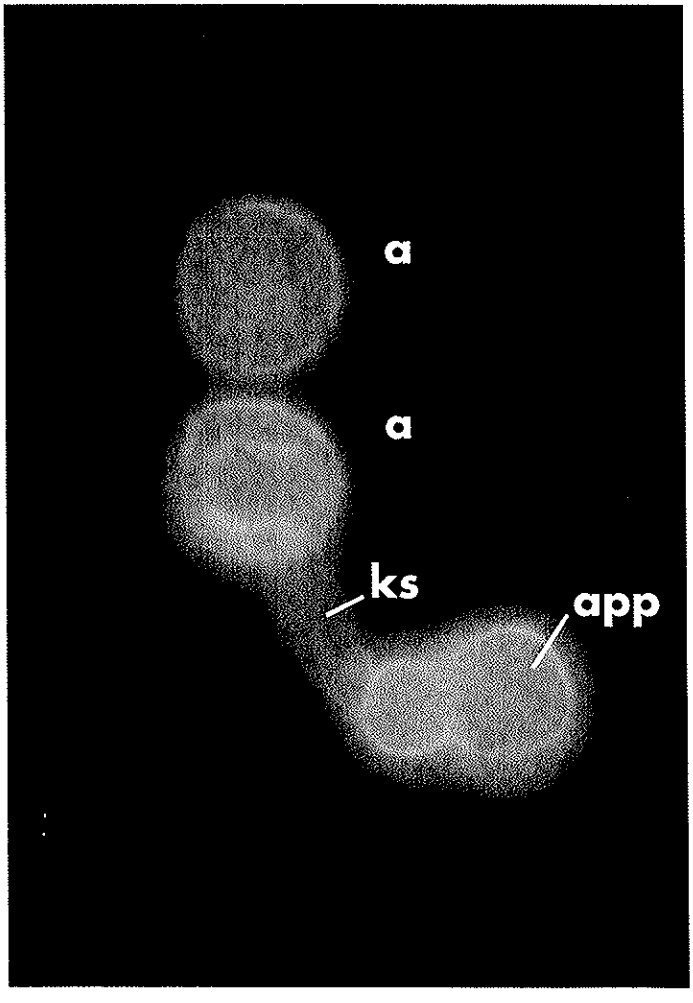
°Mittelwerte der Fraktionen, der mit Myzel durchwachsenen Blattfläche ± Standardfehler von neun verschiedenen Pflanzen.

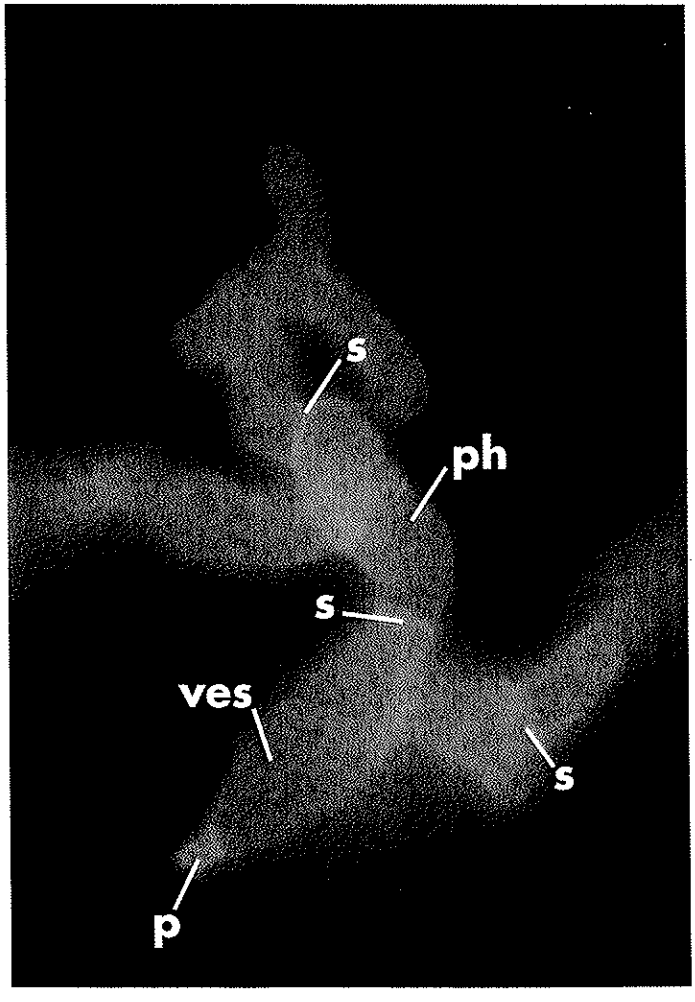
Wirt-Pathogen-Wechselwirkungen

In einer weiteren Studie, bei der drei Pflanzenlinien mit drei Rostlinien kombiniert wurden zeigte sich, dass keine signifikanten Interaktionen zwischen Wirt und Pathogen stattfanden (Tab. 1), was auf das Vorhandensein einer Gen-für-Gen-Wechselwirkung schliessen würde. Die Holländische Pflanzenlinie war in bezug auf alle getesteten Rostlinien am anfälligsten und die holländische Rostlinie zudem auf allen drei Pflanzenlinien die aggressivste. Die gemessene Fraktion der mit Mycel durchwachsenen Blattfläche zeigte ein kontinuierliches Spektrum an Resistenz gegenüber *P. lagenophorae*. Im Rahmen der untersuchten Pflanzen- und Rostlinien kann deshalb von sogenannter quantitativer, rassenunspezifischer Resistenz gesprochen werden.

Abb. 6. ◄ Mittels Calcofluor (Fluka, Fluoreszenzfarbstoff) angefärbte, gekeimte Aecidiospore mit Appressorium des Rostpilzes *P. lagenophorae* auf dem Wirtspflanzenblatt. Acht Stunden nach Inokulation. Fluoreszenzmikroskop x 1000. *a*, Aecidiospore; *ks*, Keimschlauch; *app*, Appressorium.

Abb. 7. ▼ Infektionsstrukturen in der pflanzlichen Epidermiszelle 48 Stunden nach Infektion. Fluoreszenzmikroskop x1800. *p*, Penetrationskegel; *ves*, intra- epidermales Vesikel; *s*, Septum; *ph*, primäre Hyphe.





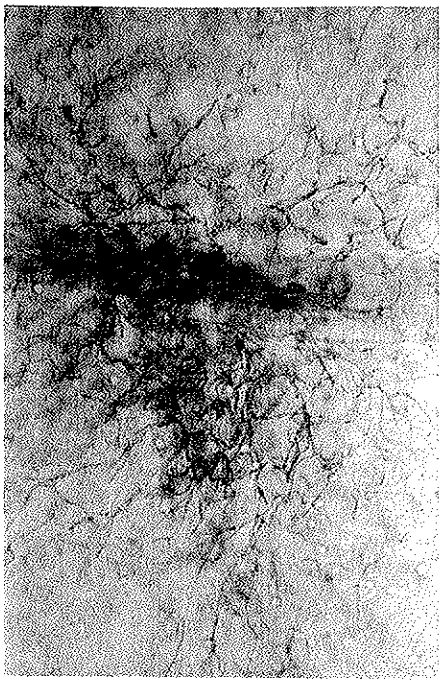
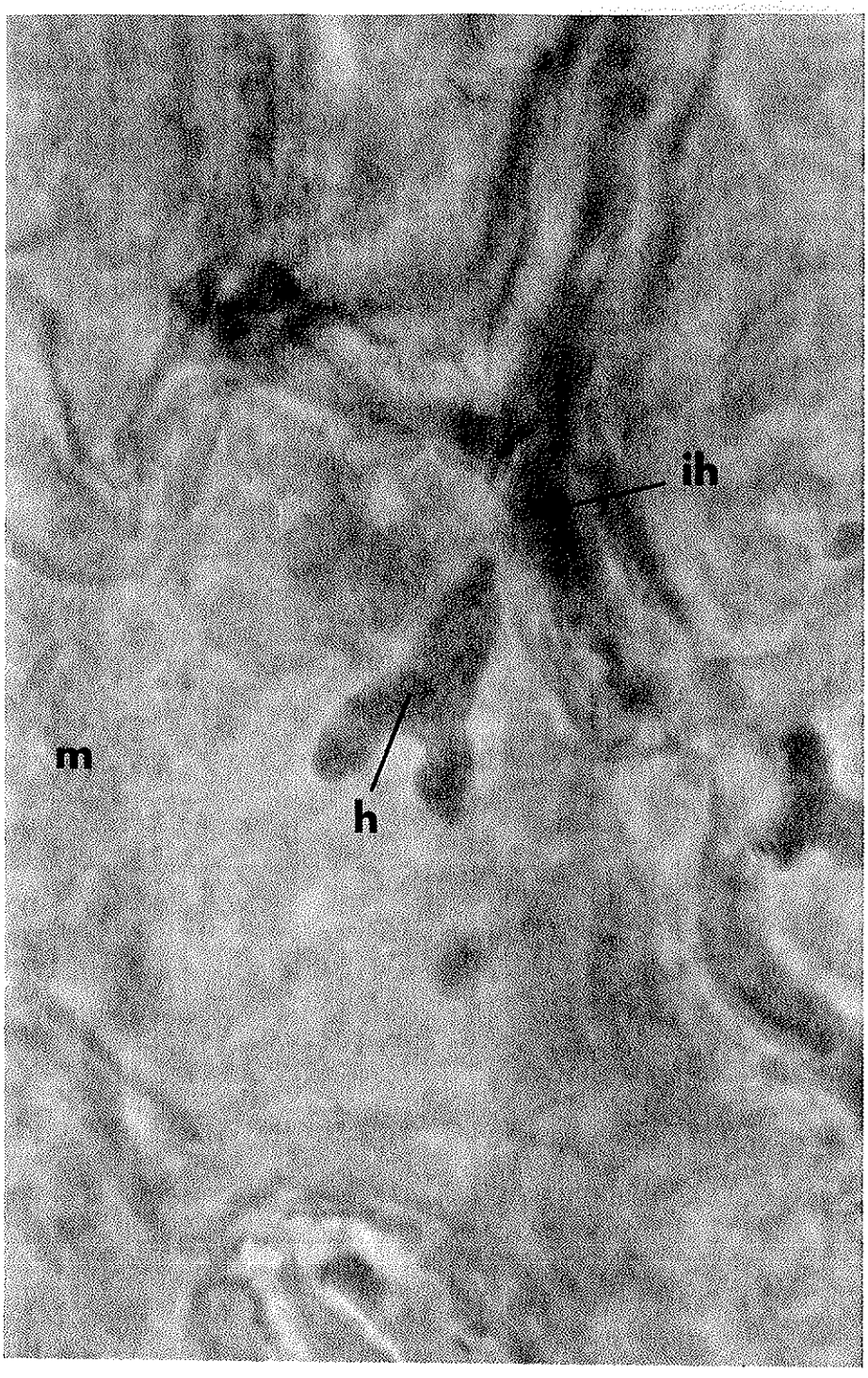


Abb. 8. ▲ Kolonie im Blattgewebe sechs Tage nach der Infektion; Lichtmikroskop x 250.

Abb. 9. ▶ Ausbildung von fingerförmigen M-Haustorien bei *P. lagenophorae* im Mesophyllgewebe sechs Tage nach Infektion. Lichtmikroskop x 950. *h*, Haustorie; *m*, Mesophyllzelle; *ih*, interzelluläre Hyphe.



Bedeutung für die biologische Bekämpfung

Im Gegensatz zur qualitativen Resistenz werden im Falle von quantitativer Resistenz trotz Reduktion des pilzlichen Krankheitspotentials immer noch Sporen ausgebildet und verbreitet. Eine biologische Bekämpfungsstrategie mit *P. lagenophorae* wird daher nicht in Frage gestellt. Unsere Resultate zeigen eine Erhöhung der Krankheitsintensität individueller Genotypen (Pflanzenlinien) durch die aggressive Rostlinie aus Holland. Eine grössere mit Myzel durchwachsene Blattfläche führt auch zu einer grösseren Sporenproduktion und somit zu einer besseren Stimulation einer Krankheitsepidemie. Das Ausmass einer solchen Epidemie kann aus diesen Daten jedoch nicht vorhergesehen werden und Abklärungen in dieser Richtung erfolgen zurzeit an der Universität Fribourg (Frantzen und Müller-Schärer 1998). Das Reproduktionspotential der meisten Pilze ist jedoch enorm hoch.

Zurzeit sind Abklärungen im Gange, die beobachtete Resistenz mit Hilfe von niedrigdosierten Herbiziden zu durchbrechen und dadurch den schädigenden Einfluss des Pathogens zu erhöhen. Noch liegen keine Daten über die genotypische Variabilität des Rostpilzes vor und das Wissen über die sexuelle Reproduktion ist sehr beschränkt. Längerfristig betrachtet können die beobachteten Unterschiede in der Krankheitsintensität zwischen Pflanzenlinien und die Selektion von aggressiveren Rostlinien zur Bildung von weniger anfälligen Unkrautpopulationen führen. Da jedoch die Unterschiede zwischen den Pflanzenlinien in ihrer Empfindlichkeit gegenüber dem Rostpilz klein sind ist anzunehmen, dass andere Faktoren, welche die Fitness von *S. vulgaris* beeinflussen, die pflanzenlinien-spezifische Wirkung des Rostpilzes überdecken oder zumindest verringern können. Die Nachhaltigkeit der geplanten biologischen Kontrollstrategie würde dadurch erhöht.

LITERATUR

Frantzen J. and Müller-Schärer H., 1998. A theory relating focal epidemics to crop-weed interactions. *Phytopathology* **88**, 180-184.

Mayor E., 1962. A propos d'un *Peronospora* sur *Myagrum perfoliatum* L. et d'un *Puccinia* sur *Senecio vulgaris* L. *Berichte der Schweizerischen Botanischen Gesellschaft* **72**, 262-271.

Müller-Schärer H. und Wyss G.S., 1994. Das Gemeine Kreuzkraut (*Senecio vulgaris* L.): Problemunkraut und Möglichkeiten der biologischen Bekämpfung. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*, Sonderheft **XIV**, 201-209.

Müller-Schärer H. and Frantzen J., 1996. An emerging system management approach for biological weed control in crops: *Senecio vulgaris* as a research model. *Weed Research* **36**, 483-491.

Müller-Schärer H. and Rieger S., 1998. Epidemic spread of the rust fungus *Puccinia lagenophorae* and

its impact on the competitive ability of *Senecio vulgaris* in celeriac during early development. *Biocontrol Science and Technology* **8**, 59-72.

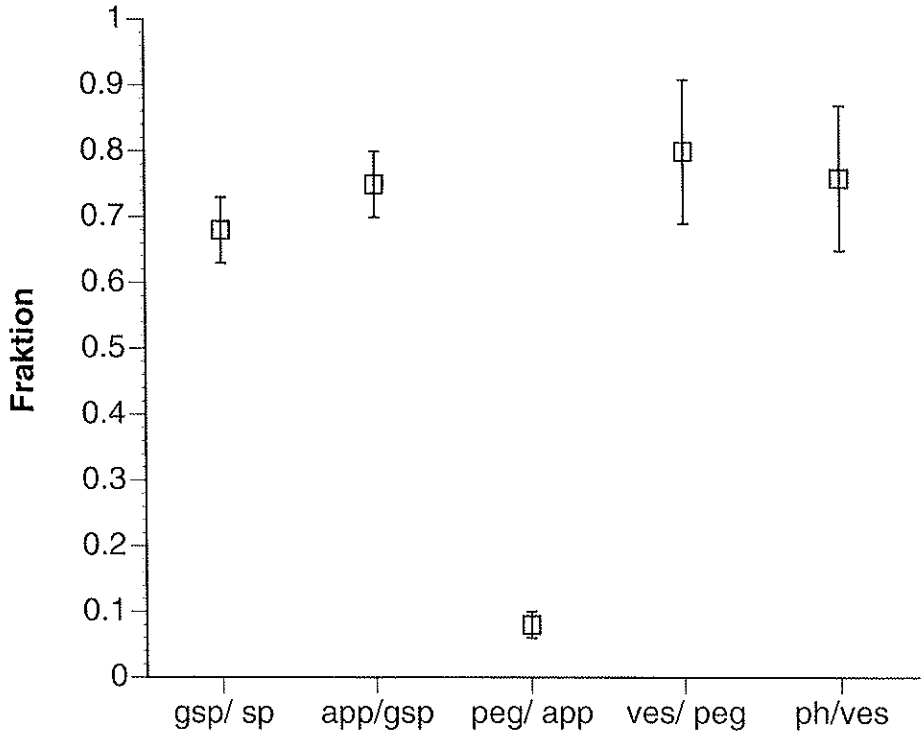
Wilson I.M., Walshaw D.F. and Walker J., 1965. The new groundsel rust in Britain and its relationship to certain Australasian rusts. *Transactions of the British Mycological Society* **48** 501-511.

Wyss G.S., 1995. Gemeines Kreuzkraut mit Rostpilz bekämpfen. *Der Gemüsebau* **17**, 5-6.

Wyss G.S., 1997. Quantitative resistance in the weed-pathosystem *Senecio vulgaris* L.-*Puccinia lagenophorae* Cooke. Ph.D. thesis, Swiss Federal Institute of Technology Zürich (ETHZ).

Wyss G.S. and Müller-Schärer H., 1995. Accidial infection process of *Puccinia lagenophorae* Cooke on *Senecio vulgaris* L.: relevance for biological weed control In: 9th International Symposium on Challenges for Weed Science in a Changing Europe in Budapest, 1995. *Edited by* L. Radics. European Weed Research Society, City, pp. 685-686.

Zadoks J.C. and Schein R.D., 1979. Epidemiology and Plant Disease Management. Oxford University Press, Inc., Oxford.



Uebergänge zwischen Infektionsstrukturen

Abb. 10. Quantifikation des Infektionsprozesses des Rostpilzes *P. lagenophorae* auf *S. vulgaris*. Darstellung der Mittelwerte der Fraktionen und Standardfehler von je sechs Pflanzen, von drei Pflanzenlinien und drei Pflanzenstadien (total 54 Pflanzen). Infektionsstrukturen wurden 48 Stunden nach Inokulation angefärbt und auf einer Fläche von 0,56 cm² ausgezählt. *sp*, total Anzahl Sporen; *gsp*, gekeimte Sporen; *app*, Appressorien; *peg*, Penetrationskegel; *ves*, intraepidermales Vesikel; *ph*, primäre Hyphe.

DANK

Dieser Artikel ist ein Auzug aus der Dissertation ETH Nr. 12196. Die Arbeiten wurden an der FAW durchgeführt und verdankungsvoll von Prof. Martin S. Wolfe, Prof. Heinz Müller-Schärer und Dr. Jos Frantzen betreut.

RÉSUMÉ

Lutte biologique contre les mauvaises herbes: suivre la trace des mécanismes de résistance

Nous avons étudié les mécanismes en jeu dans la résistance quantitative de *Senecio vulgaris* à la rouille *Puccinia lagenophorae* Cooke dans une optique de contrôle biologique de la plante, selon l'approche du «system management». Le processus d'infection de *P. lagenophorae* sur *S. vulgaris* a été étudié par microscopie optique, à fluorescence et électronique. Celui-ci a été quantifié selon l'analyse des composantes. L'étape la plus sensible de l'infection est le développement d'un tube de pénétration et d'un appressorium. C'est donc à ce stade de l'infection que la résistance a été déterminée. Des tests de la résistance à trois souches de *P. lagenophorae* chez trois lignées de l'hôte *S. vulgaris* suggère que la résistance n'est pas «race specific». Une souche aggressive de *P. lagenophorae* pourrait contrôler *S. vulgaris* tout en n'éliminant pas les différences quantitatives de résistance entre les lignées de plantes. Théoriquement, l'utilisation à long terme de la souche de rouille la plus agressive pour le contrôle biologique de *S. vulgaris* pourrait entraîner un accroissement de l'intensité de la résistance à *P. lagenophorae*. Néanmoins, comme les différences de susceptibilité entre lignées de plantes sont faibles, il est raisonnable de postuler que d'autres facteurs diminuent ou effacent les effets du pathogène sur la «fitness» de la plante. Il n'y a donc pas lieu de remettre en cause l'utilisation d'une stratégie de lutte biologique.

SUMMARY

Biological control of weeds: tracking the resistance mechanisms

Quantitative resistance of *Senecio vulgaris* L. to the rust fungus *Puccinia lagenophorae* Cooke was investigated in terms of underlying mechanisms and relevance for biological weed control following the system management approach. The infection process of *P. lagenophorae* on *S. vulgaris* was studied by light, fluorescence and scanning electron microscopy. The infection process was quantified using component analysis. The most sensitive phase of the infection process was the development of a penetration peg from an appressorium. Resistance was determined at this stage of the infection process. Results of a further series of experiments using three plant lines of *S. vulgaris* and three *P. lagenophorae* lines indicated that resistance was race non-specific. An aggressive strain of *P. lagenophorae* might control *S. vulgaris*. The use of an aggressive strain does, however, not eliminate differences in resistance between plant lines. On a long time scale, resistance to *P. lagenophorae* might theoretically increase in *S. vulgaris* populations due to biological weed control. However, differences in susceptibilitty among plant lines were relatively small. Other factors influencing the fitness of *S. vulgaris* plants may alleviate or override the plantline-specific effects imposed by the rust pathogen and thus, enhance the sustainability of the envisaged biological control strategy.

KEY WORDS: biological control, system management approch, *Puccina lagenophorae*, *Senecio vulgaris*, infection process, quantitative resistance